

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA E ESTUDO DE ESTABILIDADE DE TIGECICLINA
EM PRODUTO FARMACÊUTICO**

LUCÉLIA MAGALHÃES DA SILVA

ORIENTADORA: Profa. Dra. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

Araraquara-SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

***DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA E
ESTUDO DE ESTABILIDADE DE TIGECICLINA EM PRODUTO
FARMACÊUTICO***

LUCÉLIA MAGALHÃES DA SILVA

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

**Araraquara-SP
2012**

LUCÉLIA MAGALHÃES DA SILVA

***Desenvolvimento e validação de metodologia analítica e
estudo de estabilidade de tigeciclina em produto
farmacêutico***

Comissão examinadora da tese para obtenção do grau de doutor

Prof. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Prof. Dr. Edison Luis Santana Carvalho

Prof. Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim

Prof. Dr. Marlus Chorilli

Prof. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara-SP
2012

*“Pelos prados e campinas verdejantes eu vou
É o Senhor que me leva a descansar
Junto às fontes de águas puras repousantes eu vou
Minhas forças o Senhor vai animar...”
Padre Zezinho*

*“...Fui sempre aquilo que sou, sou sempre aquilo que fui,
Porque a vida não dilui o que a mãe terra gerou...
Sou o brasedo que ficou e aceso permaneceu,
Sou o gaúcho que cresceu junto aos fortins de combate
E já estava tomando mate quando a pátria amanheceu!!!...”
Jayme Caetano Braun*

AGRADECIMENTOS

Finalizar esta tese de doutorado é ir além do imaginado. Chegar tão longe partindo de onde parti é a prova que não existem obstáculos quando se tem perseverança, coragem e cultivo de valores recebidos na família.

Este é meu humilde reconhecimento a todos os que participaram desta jornada. Gostaria de agradecer:

Sempre a Deus, pelo dom precioso da vida e por estar sempre ao meu lado, apresentando alternativas nos momentos mais difíceis, e por me dar sabedoria e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, por serem meu exemplo de luta e incansável busca por uma vida melhor e por me mostrarem que na vida é preciso muito esforço e humildade.

A minhas irmãs Laurizane e Elizane, cunhados Jorge e André e queridos sobrinhos Pedro Luiz, Luiz Arthur e Eduardo, agradeço por todo o apoio, confiança e carinho. Amo muito vocês.

À Profa Dra Hérica Regina Nunes Salgado, obrigada pela oportunidade oferecida, por sua paciência e amizade e pelo exemplo de competência e dedicação à vida acadêmica.

Aos amigos Lucas Chierentin, Flávia Fiorentino, Edith Cristina e Fátima Rodrigues, pelo apoio técnico e, principalmente, pela amizade e bons momentos vividos dentro e fora da universidade. Vocês sempre estarão no meu coração.

Aos amigos dos laboratórios do Departamento de Fármacos e Medicamentos: Patrícia, Ana Carolina, Tahisa, Eliane, Andressa, Josilene, Rudy, Eliete, Hilris, Fernanda, Jéssica e Bruna por participarem deste processo de amadurecimento, pelo apoio, convivência e momentos felizes, sentirei saudades.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, pela contribuição em minha formação científica.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus Araraquara.

Às instituições de apoio à pesquisa, PADC-FCF, FUNDUNESP, FAPESP e CNPq pelos incentivos aos projetos do laboratório de controle de qualidade.

À FAPESP pela bolsa de doutorado concedida.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação e para que este trabalho se concretizasse.

RESUMO

As glicilciclinas são uma nova classe de antibacterianos, análogos sintéticos das tetraciclinas, com atividade bacteriostática contra ampla variedade de bactérias e também contra micro-organismos resistentes às tetraciclinas. A tigeciclina é a primeira glicilciclina aprovada, distribuída comercialmente como Tygacil[®] pelo laboratório Wyeth, na forma farmacêutica pó liofilizado, com registro no Ministério da Saúde concedido em 2005. Este fármaco apresenta amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina, sendo indicada para o tratamento de infecções complicadas da pele, tecidos moles e intra-abdominais. A tigeciclina age na inibição da síntese proteica através da ligação à subunidade 30S do ribossomo bacteriano. Por ser um medicamento recente, existem poucos estudos relacionados às características físico-químicas, desenvolvimento de métodos analíticos e estudo de estabilidade, aplicados à tigeciclina. Assim, os objetivos desse trabalho foram desenvolver métodos para análise qualitativa e quantitativa de tigeciclina em pó liofilizado, bem como estudos de estabilidade. Para análise qualitativa estudaram-se os métodos por análise térmica, espectrofotometria nas regiões do infravermelho, ultravioleta e visível, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), possibilitando a identificação da amostra. Para quantificação do fármaco validaram-se métodos por CLAE, microbiológicos e espectrofotométricos. O método por CLAE utilizou comprimento de onda de detecção de 280 nm, fase móvel composta por tampão fosfato de sódio monobásico (0,015 M) e ácido oxálico (0,015 M), pH 7,0 e acetonitrila (75:25, v/v), obtendo-se tempo de retenção médio de 8,6 minutos e capacidade de separação de produtos de degradação. A faixa linear avaliada foi de 40 a 100 µg/mL, com exatidão de 99,01%. Os ensaios microbiológicos por métodos de difusão em ágar e turbidimétrico utilizaram os micro-organismos *Bacillus subtilis* ATCC 9372 IAL 1027 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 IAL 1606, com faixa linear de 3-12 µg/mL e 3-4,32 µg/mL, respectivamente. O método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 245 nm, com faixa de linearidade de 10,0 a 22,0 µg/mL e exatidão de 100,84%, utilizou água como solvente. O método espectrofotométrico na região do visível a 378 nm aplicou reação de tigeciclina e acetato de cobre 5,0%, com faixa de linearidade de 10,0 a 34,0 µg/mL e exatidão de 99,10%, destacando-se por ser um método livre de solvente orgânico. Os métodos desenvolvidos não apresentaram diferença estatística para nível de significância de 5%. Realizaram-se estudos de estabilidade de amostras de pó liofilizado de tigeciclina, aplicando-se os métodos desenvolvidos para avaliação do teor de tigeciclina nas amostras. O produto farmacêutico apresentou boa estabilidade nas condições estudadas. Os métodos desenvolvidos neste trabalho contribuem para avaliação da qualidade, segurança e eficácia terapêutica de tigeciclina em pó liofilizado, além de ampliar os conhecimentos científicos relacionados a este novo antimicrobiano.

Palavras-chave: tigeciclina, glicilciclinas, controle de qualidade, métodos analíticos, estabilidade, validação.

ABSTRACT

The glycylicyclines are a new class of antibacterials, synthetic analogs of tetracyclines, with bacteriostatic activity against broad spectrum of bacterias and tetracyclines resistant organisms. The tigecycline is the first approved glycylicycline, commercially distributed in lyophilized powder pharmaceutical product as TygacilTM, by the Wyeth Pharmaceutical Laboratory, with register in the Brazilian Ministry of Healthy granted in 2005. This drug presents broad spectrum action, with activity against Gram-positive, Gram-negative, aerobic and anaerobic bacterias, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus* spp., indicated to treatment of complicated skin and skin structure infections and complicated intra-abdominal infections. Tigecycline binds to the bacterial 30S ribosome, preventing the bacterial protein synthesis. Take into account that tigecycline is a new product, there are few studies related to physicochemical characteristics, analytical methods development and stability studies, applied to this drug. Thus, the aims of this work were to develop methods to qualitative and quantitative analysis of tigecycline in lyophilized powder as well as stability studies. To qualitative analysis, thermal analysis, infra-red, ultraviolet and visible spectrophotometry, thin layer chromatography and high performance liquid chromatography methods were studied, allowing the identification of samples. To drug quantification high performance liquid chromatography (HPLC), spectrophotometric and microbiological methods were validated. The HPLC method employed detection wavelength at 280 nm, mobile phase consisted of buffer containing sodium phosphate monobasic (0.015 M) and oxalic acid (0.015 M) (pH 7.0): acetonitrile (75:25, v/v), obtaining retention time of 8.6 minutes and degradation products separation ability. The evaluated linear range was from 40 to 100 µg/mL, with accuracy of 99.01%. The microbiological assays by agar diffusion and turbidimetric methods, applied *Bacillus subtilis* ATCC 9372 IAL 1027 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 IAL 1606 organisms, with linear range of 3-12 µg/mL and 3-4.32 µg/mL, respectively. The ultraviolet spectrophotometric method at 245 nm, with concentration linear range from 10 to 22 µg/mL and accuracy of 100.84%, used the solvent water. The organic solvent free visible spectrophotometric method at 378 nm, applied reaction between tigecycline and copper acetate, with linear range from 10 to 34 µg/mL and accuracy of 99.10%. The developed methods showed no statistical difference for a significance level of 5%. Stability studies to samples of lyophilized powder were carried out, applying the developed methods to content evaluation of tigecycline in these samples. The pharmaceutical product showed good stability in the studied conditions. The developed methods contribute to quality, therapeutic safety and efficacy evaluation of tigecycline in lyophilized powder, and to expand the scientific knowledge related to this new antibiotic.

Keywords: tigecycline, glycylicyclines, quality control, analytical methods, stability, validation.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4. DESCRIÇÃO.....	22
5. ANÁLISE QUALITATIVA.....	25
5.1. Características físicas.....	26
5.1.1. Método.....	26
5.1.2. Resultados.....	26
5.2. Reação de identificação.....	26
5.2.1. Método.....	26
5.2.2. Resultados.....	27
5.3. Determinação da faixa de fusão.....	27
5.3.1. Método.....	27
5.3.2. Resultados.....	27
5.4. Análise térmica.....	28
5.4.1. Método.....	29
5.4.2. Resultados.....	29
5.4.3. Discussão.....	32
5.5. Espectrofotometria de absorção na região de infravermelho.....	33
5.5.1. Método.....	33
5.5.2. Resultados.....	33
5.5.3. Discussão.....	36
5.6. Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.....	37
5.6.2. Método.....	39
5.6.3. Resultados.....	39
5.6.4. Discussão.....	40
5.7. Espectrofotometria de absorção na região do visível.....	41

5.7.2. Método.....	42
5.7.3. Resultados.....	42
5.7.4. Discussão.....	44
5.8. Cromatografia em camada delgada.....	44
5.8.2. Método.....	45
5.8.3. Resultados.....	46
5.8.4. Discussão.....	51
6. ANÁLISE QUANTITATIVA.....	53
6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	54
6.1.6. Método.....	56
6.1.7. Validação do método.....	61
6.1.8. Resultados.....	71
6.1.9. Discussão.....	87
6.2. Ensaio microbiológico – método difusão em ágar.....	90
6.2.5. Ensaio.....	94
6.2.8. Validação do método.....	96
6.2.9. Resultados.....	98
6.2.10. Discussão.....	105
6.3. Ensaio microbiológico – método turbidimétrico.....	107
6.3.5. Ensaio.....	111
6.3.8. Validação do método.....	111
6.3.9. Resultados.....	113
6.3.10. Discussão.....	118
6.4. Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	120
6.4.3. Método.....	121
6.4.7. Validação do método.....	124
6.4.8. Resultados.....	126
6.4.9. Discussão.....	135
6.5. Espectrofotometria na região do visível.....	137
6.5.3. Método.....	141
6.5.7. Validação do método.....	143
6.5.8. Resultados.....	146

6.5.9. Discussão.....	155
6.6. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS.....	157
6.6.1. Resultados.....	158
6.6.2. Discussão.....	159
6.7. DISCUSSÃO GERAL.....	160
6.8. ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	163
6.8.1. Resultados.....	166
6.8.2. Discussão.....	168
7. ARTIGOS PUBLICADOS.....	169
8. CONCLUSÕES.....	171
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	173

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estruturas das principais tetraciclinas usadas na clínica médica.....	8
Figura 3.2. Compostos relacionados da tigeciclina detectados em soro humano (S), urina (U) e fezes (F).....	15
Figura 4.1.1. Estrutura química da tigeciclina (CAS : 220620-09-7).....	23
Figura 5.4.1. Curvas termogravimétricas obtidas na análise de tigeciclina SQR e pó liofilizado e lactose monoidratada.....	30
Figura 5.4.2. Alteração da escala da Figura 5.4.1 para melhor visualização dos eventos ocorridos na faixa de 0-300 °C.....	30
Figura 5.4.3. Curvas de DSC obtidas na análise de tigeciclina SQR e pó liofilizado e lactose monoidratada.....	31
Figura 5.5.1. Espectro na região de infravermelho de tigeciclina SQR em pastilhas de KBr.....	34
Figura 5.5.2. Espectro na região de infravermelho de tigeciclina pó liofilizado em pastilhas de KBr.....	34
Figura 5.5.3. Espectro na região de infravermelho de lactose monoidratada em pastilhas de KBr.....	35
Figura 5.5.4. Espectros na região de infravermelho de tigeciclina SQR, tigeciclina pó liofilizado e lactose monoidratada sobrepostos.....	35

Figura 5.6.1. Espectro de absorção da solução de tigeciclina SQR com concentração de 16,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando água como solvente.....	38
Figura 5.6.2. Espectro de absorção da solução de tigeciclina SQR com concentração de 16,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando metanol como solvente.....	38
Figura 5.6.3. Espectro de absorção da solução de tigeciclina SQR com concentração de 16,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente.....	39
Figura 5.6.4. Espectro de absorção de solução de tigeciclina SQR com concentração de 16,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando hidróxido de sódio 0,1 M como solvente.....	40
Figura 5.7.1. Espectro de absorção na região do visível da solução de tigeciclina SQR na concentração de 22 µg/mL, após reagir com acetato de cobre, em pH 3,0, utilizando água como solvente.....	43
Figura 5.7.2. Comparação dos espectros de absorção na região do visível de tigeciclina SQR, em pH 3,0, na concentração de 22 µg/mL, na ausência (λ máximo: 350 nm) e presença de acetato de cobre (λ máximo: 378 nm), utilizando água como solvente.....	43
Figura 5.8.1. Cromatogramas obtidos de tigeciclina SQR (1) e tigeciclina pó liofilizado (2) na concentração de 1,5 mg/mL. As soluções de tigeciclina foram preparadas em água (^a), metanol (^b) e em água seguida de metanol (^c).....	47
Figura 5.8.2. Cromatogramas obtidos de tigeciclina SQR (1) e tigeciclina pó liofilizado (2), ambos diluídos em metanol.....	48
Figura 5.8.3. Cromatogramas obtidos de tigeciclina pó liofilizado, diluído em metanol, intacto (2) e após degradação: ácida (3), básica (4), mistura da ácida + básica (3+4), neutra (5), fotolítica (6) e oxidativa (7). Sendo (8) o branco da degradação oxidativa, (9) da básica, (10) da neutra, (11) da fotolítica e (12) da ácida.....	49

Figura 5.8.4. Cromatogramas obtidos de tigeciclina pó liofilizado, diluído em metanol, intacto (1) e após degradação: básica (2), ácida (3), neutra (4), oxidativa (5) e fotolítica (6). Sendo (7) a mistura dos degradados. A revelação foi realizada em vapor de iodo (A) e em câmara UV (luz UVA 365 nm) (B)..... **50**

Figura 5.8.5. Cromatograma obtido de tigeciclina SQR e pó liofilizado, revelado em vapor de iodo..... **51**

Figura 6.1.1. Cromatogramas de tigeciclina pó liofilizado (70 µg/mL) obtidos com diferentes fases móveis: (A) ácido acético 0,5 % : acetonitrila (95:5 v/v), (B) ácido acético 0,5 % : metanol (95:5 v/v), (C) ácido oxálico 0,02 M pH 3,0 : acetonitrila (88:12 v/v), (D) ácido fosfórico 0,025 M + EDTA 5mM : acetonitrila (89:11 v/v), (E) ácido fosfórico 0,025 M pH 2,5 : acetonitrila (90:10 v/v), (F) ácido fosfórico 0,025 M pH 3,0 : acetonitrila (89:11v/v), (G) ácido fosfórico 0,025 M (pH 3,0, ajustado com trietilamina) : acetonitrila (92:08 v/v) e (H) ácido fosfórico 0,025 M + ácido oxálico 0,01 M (pH 7,0) : metanol: acetonitrila (45:27,5: 27,5 v/v)..... **58**

Figura 6.1.2. Cromatogramas de tigeciclina pó liofilizado (70 µg/mL) obtidos com diferentes fases móveis: (I) fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0: acetonitrila (60:40 v/v), (J) fosfato de sódio monobásico 0,03 M pH 2,5: acetonitrila (90:10 v/v), (K) fosfato de sódio monobásico 0,03 M pH 2,5: acetonitrila (90:10 v/v), após degradação em solução. HCl 0,1 M por 8 horas, sob aquecimento (70 °C), (L) fosfato de sódio monobásico 0,03 M pH 3,0: acetonitrila (84:16 v/v), vazão de 0,5 mL/min, (M) fosfato de sódio monobásico 0,01 5M + ácido oxálico 0,01 5M pH 7,0: acetonitrila (70:30 v/v), (N) fosfato de sódio monobásico 0,015 M + ácido oxálico 0,015 M pH 7,0: metanol (40:60 v/v), (O) fosfato de sódio monobásico 0,03 M pH 6,0: acetonitrila (67: 33 v/v), vazão 0,8 mL/min e (P) trietilamina 0,4% (pH 7,0 ajustado com ácido fosfórico): acetonitrila (70:30 v/v)..... **59**

Figura 6.1.3. Cromatograma típico de tigeciclina SQR (70 µg/mL) obtido pelo método cromatográfico proposto..... **71**

Figura 6.1.4. Cromatograma da degradação de tigeciclina (70 µg/mL) em meio básico (NaOH 0,1 M) após 5 horas a 70 °C.....	72
Figura 6.1.5. Cromatograma da degradação de tigeciclina (70 µg/mL) em meio ácido (HCl 0,1 M) após 5 horas a 70 °C.....	73
Figura 6.1.6. Cromatograma da degradação de tigeciclina (70 µg/mL) em meio neutro (água) após 7 horas a 70 °C.....	73
Figura 6.1.7. Cromatograma da degradação de tigeciclina (70 µg/mL) em meio oxidativo (peróxido de hidrogênio 3%) após 15 minutos.....	74
Figura 6.1.8. Cromatograma da degradação de tigeciclina (70 µg/mL) na luz ultravioleta após 24 horas.....	74
Figura 6.1.9. Curva analítica de tigeciclina SQR obtida pelo método cromatográfico.....	76
Figura 6.1.10. Espectro de massas da tigeciclina em pó liofilizado: (A) solução amostra de tigeciclina intacta.....	84
Figura 6.1.11. Espectro de massas da tigeciclina em pó liofilizado: (B) após degradação ácida.....	84
Figura 6.1.12. Espectro de massas da tigeciclina em pó liofilizado: (C) após degradação básica.....	85
Figura 6.1.13. Espectro de massas da tigeciclina em pó liofilizado: (D) após degradação fotolítica.....	85
Figura 6.1.14. Espectro de massas da tigeciclina em pó liofilizado: (E) após oxidação.....	86

Figura 6.1.15. Espectro de massas da tigeciclina em pó liofilizado: (F) após degradação neutra.....	86
Figura 6.2.1. Delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções substância de referência (P) e amostra (A) na placa de Petri, em que P1 (3 µg/mL); P2 (6 µg/mL); P3 (12 µg/mL) e A1 (3 µg/mL); A2 (6 µg/mL); A3 (12 µg/mL).....	95
Figura 6.2.2. Placa de Petri com os halos de inibição de crescimento do micro-organismo <i>B. subtilis</i> ATCC 9372 IAL 1027, obtidos com as doses 3,0; 6,0 e 12,0 µg/mL de tigeciclina SQR e pó liofilizado	100
Figura 6.2.3. Curvas analíticas de soluções de tigeciclina SQR e amostra, em concentrações de 3,0; 6,0 e 12,0 µg/mL, obtidas pelo método microbiológico de difusão em ágar.....	102
Figura 6.3.1. Curvas analíticas de soluções de tigeciclina SQR e pó liofilizado, em concentrações de 3,0; 3,6 e 4,32 µg/mL, obtidas pelo método microbiológico turbidimétrico.....	115
Figura 6.4.1. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para tigeciclina SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 245 nm.....	128
Figura 6.4.2. Curva analítica de tigeciclina SQR, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando água como solvente, a 245 nm.....	130
Figura 6.4.3. Espectro da solução placebo para verificação de ausência de absorção do excipiente da formulação na região do ultravioleta utilizada no método.....	134
Figura 6.5.1. Curva das leituras de absorvância <i>versus</i> diferentes volumes de solução de acetato de cobre a 5%, com constantes concentração de tigeciclina (34 µg/mL) e pH 3,0.....	140
Figura 6.5.2. Estrutura sugerida para o produto da reação entre tigeciclina e cobre.....	141

Figura 6.5.3. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível para tigeciclina SQR, após reação com acetato de cobre a 5%, em pH 3,0.....	148
Figura 6.5.4. Curva analítica de tigeciclina SQR, obtida a 378 nm pelo método espectrofotométrico na região do visível.....	150
Figura 6.5.5. Espectro da solução preparada com placebo em substituição a solução de tigeciclina, para verificação de ausência de reação entre lactose e acetato de cobre.....	154
Figura 6.8.1. Análise comparativa de teor das amostras de pó liofilizado de tigeciclina, armazenadas por 9 meses a 30 °C/ 75% UR, analisadas pelos métodos propostos.....	168

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.5.1. Faixas de frequências e grupamentos correspondentes das bandas observadas nos espectros de infravermelho de tigeciclina SQR e pó liofilizado.....	36
Tabela 6.1.1. Parâmetros otimizados para a determinação de tigeciclina em pó liofilizado pelo método CLAE.....	61
Tabela 6.1.2. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico.....	64
Tabela 6.1.3. Combinação fatorial de parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo Teste de Youden.....	67
Tabela 6.1.4. Parâmetros analíticos e variações efetuadas no teste de Youden 1.....	67
Tabela 6.1.5. Parâmetros analíticos e variações efetuadas no teste de Youden 2.....	68
Tabela 6.1.6. Valores das áreas referentes ao pico de tigeciclina SQR para construção da curva analítica do método cromatográfico.....	75
Tabela 6.1.7. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de tigeciclina SQR, utilizando o método por CLAE.....	77
Tabela 6.1.8. Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método analítico para análise de tigeciclina por CLAE.....	78
Tabela 6.1.9. Determinação da exatidão do método analítico para análise tigeciclina por CLAE.....	79
Tabela 6.1.10. Resultados de cada variação obtidos nos Testes de Youden 1 e 2.....	80

Tabela 6.1.11. Parâmetros os da avaliação da robustez do método analítico para análise de tigeciclina por CLAE.....	81
Tabela 6.1.12. Parâmetros avaliados na análise de adequabilidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de tigeciclina.....	82
Tabela 6.2.1. Parâmetros estudados para a avaliação de potência de tigeciclina em pó liofilizado pelo método de difusão em ágar.....	91
Tabela 6.2.2. Parâmetros padronizados para avaliação de tigeciclina em produtos farmacêuticos por ensaio microbiológico – método difusão em ágar.....	92
Tabela 6.2.3. Diâmetros dos halos de inibição obtidos no ensaio microbiológico para avaliação de tigeciclina em produtos farmacêuticos – método difusão em ágar.....	101
Tabela 6.2.4 Análise de variância das medidas dos halos de inibição determinados na obtenção das curvas analíticas de tigeciclina, utilizando o método de difusão em ágar.....	103
Tabela 6.2.5. Valores determinados de potência de tigeciclina em pó liofilizado na avaliação da precisão do método de difusão em ágar.....	104
Tabela 6.2.6. Teste de recuperação do método de difusão em ágar.....	104
Tabela 6.2.7. Parâmetros determinados na avaliação da robustez do método microbiológico para análise de tigeciclina por difusão em ágar.....	105
Tabela 6.3.1. Parâmetros estudados para a avaliação de potência de tigeciclina em pó liofilizado pelo método turbidimétrico.....	108
Tabela 6.3.2. Parâmetros padronizados para avaliação de tigeciclina em pó liofilizado por ensaio microbiológico – método turbidimétrico.....	109

Tabela 6.3.3. Leitura das absorvâncias obtidas na avaliação de linearidade do ensaio microbiológico para avaliação de tigeciclina em pó liofilizado– método turbidimétrico.....	114
Tabela 6.3.4. Análise de variância das absorvâncias determinadas na obtenção das curvas analíticas de tigeciclina, utilizando o método turbidimétrico.....	116
Tabela 6.3.5. Valores determinados de potência de tigeciclina em pó liofilizado na avaliação da precisão do método turbidimétrico.....	117
Tabela 6.3.6. Teste de recuperação do método turbidimétrico.....	117
Tabela 6.3.7. Parâmetros determinados na avaliação da robustez do método microbiológico turbidimétrico para análise de tigeciclina em pó liofilizado.....	118
Tabela 6.4.1. Obtenção da curva de Ringbom para a determinação da faixa de linearidade do método espectrofotométrico na região do UV para análise de tigeciclina a 245 nm.....	122
Tabela 6.4.2. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV.....	125
Tabela 6.4.3. Valores obtidos na construção da curva de Ringbom pelo método espectrofotométrico na região do UV para tigeciclina SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 245 nm.....	127
Tabela 6.4.4. Valores de absorvância determinados para a curva analítica de tigeciclina SQR, pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando água como solvente, a 245 nm....	129
Tabela 6.4.5. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de tigeciclina SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do ultravioleta.....	131

Tabela 6.4.6. Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método espectrofotométrico para análise de tigeciclina em pó liofilizado.....	132
Tabela 6.4.7. Determinação da exatidão do método analítico para análise tigeciclina por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	133
Tabela 6.4.8. Parâmetros determinados na avaliação da robustez do método analítico para análise de tigeciclina por espectrofotometria.....	135
Tabela 6.5.1. Obtenção da curva de Ringbom para a determinação da faixa de linearidade do método espectrofotométrico na região do visível para análise de tigeciclina a 378 nm.....	142
Tabela 6.5.2. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do visível.....	145
Tabela 6.5.3. Valores obtidos na construção da curva de Ringbom pelo método espectrofotométrico na região do visível para tigeciclina SQR.....	147
Tabela 6.5.4. Valores de absorvância determinados em 378 nm para obtenção da curva analítica de tigeciclina SQR, pelo método espectrofotométrico na região do visível.....	149
Tabela 6.5.5. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de tigeciclina SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do visível.....	151
Tabela 6.5.6. Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método espectrofotométrico para análise de tigeciclina em pó liofilizado.....	152
Tabela 6.5.7. Determinação da exatidão do método analítico para análise tigeciclina por espectrofotometria na região do visível.....	153

Tabela 6.5.8. Avaliação da robustez do método analítico para análise de tigeciclina por espectrofotometria na região do visível.....	155
Tabela 6.6.1. Avaliação comparativa dos teores médios obtidos nos cinco métodos validados usando espectrofotometria na região do ultravioleta e visível, doseamento microbiológico pelos métodos por difusão em ágar e turbidimétrico e CLAE.....	158
Tabela 6.6.2. Análise da variância dos resultados obtidos no doseamento de tigeciclina pó liofilizado, pelos métodos propostos.....	159
Tabela 6.8.1. Valores obtidos na determinação do teor de tigeciclina em pó liofilizado utilizando os métodos propostos.....	167

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com o aumento da prevalência da resistência aos antimicrobianos tem sido crescente, especialmente, entre os patógenos Gram-positivos, com o aumento das taxas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina (PRSP), enterococos resistentes à vancomicina (VRE) e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Entre os patógenos Gram-negativos multifármacos resistentes, as bactérias produtoras de beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) são particularmente problemáticas devido à falta de opções de tratamento (PATERSON, 2000; DOERN et al., 2001; GARRISON et al., 2005; RAMPHAL e AMBROSE, 2006). O tratamento empírico de infecções tem sofrido grande impacto, devido à emergência da resistência aos antimicrobianos previamente ativos, entre bactérias clinicamente importantes (JOHNSON et al., 2001; JONES, 2001; LEVY e MARSHALL, 2004; RAMPHAL e AMBROSE, 2006).

Existe a necessidade de desenvolvimento de novos agentes capazes de superar os mecanismos de resistência existentes (BHATTACHARYA et al., 2009). As glicilciclinas, descobertas em 1993, são análogos estruturais das tetraciclinas designadas para contornar os mecanismos de resistência comuns entre bactérias resistentes a este grupo de fármacos como bomba de efluxo e proteção ribossomal. Tigeciclina, o primeiro fármaco da classe das glicilciclinas e um análogo do antimicrobiano semi-sintético minociclina, é um antimicrobiano potente e de amplo espectro, que age na inibição da tradução de proteínas em bactérias (CHOPRA, 2001).

Estudos demonstraram que a tigeciclina é altamente ativa *in vitro* contra patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, anaeróbicos e atípicos, incluindo àqueles resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos (BRADFORD et al., 2005a; ENTENZA e MOREILLON, 2009). É indicada para o tratamento de infecções complicadas da pele e tecidos moles e infecções intra-abdominais (DOAN et al., 2006). Desta forma, para um tratamento adequado, métodos analíticos devem garantir a qualidade e a dosagem correta dos medicamentos contendo este princípio ativo. É conveniente observar que a tigeciclina não está descrita em nenhum compêndio oficial e métodos validados para a análise quantitativa deste fármaco em produtos farmacêuticos não são descritos na literatura. Existem somente publicações de caráter clínico e farmacológico, relativas à determinação da tigeciclina em matrizes biológicas. Portanto, o desenvolvimento e a validação de novas metodologias, que aprimorem o controle de qualidade e que possam ser utilizadas para avaliação da estabilidade, são fundamentais para garantir a segurança e eficácia terapêutica deste

fármaco, assim como evitar a administração de doses subterapêuticas, as quais estão relacionadas com o desenvolvimento de cepas resistentes.

Nos últimos anos, as tecnologias utilizadas nas análises físico-químicas têm sofrido grandes avanços. Isto se reflete no conteúdo de códigos oficiais, nas quais técnicas automatizadas são aplicadas frequentemente. Entretanto, a utilização de métodos tradicionais validados (espectrofotométricos ou biológicos) ainda é aplicável, pois permitem que atividades do controle de qualidade possam ser executadas com amostras simples e por laboratórios com estrutura tecnológica ainda pouco desenvolvida.

Neste trabalho, foram realizadas análises qualitativas, utilizando espectrofotometria nas regiões do infravermelho, ultravioleta e visível, análise térmica, cromatografia líquida de alta eficiência e em camada delgada, além de análises quantitativas, com o desenvolvimento e validação de cinco métodos analíticos para determinação de tigeciclina em pó liofilizado. Os métodos analíticos desenvolvidos foram aplicados para análise de amostras de tigeciclina pó liofilizado submetidas a estudos de estabilidade, utilizando câmara climática, com temperatura e umidade controlada.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e validar métodos analíticos para determinação quali e quantitativa de tigeciclina em pó liofilizado e avaliar a estabilidade deste produto farmacêutico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar reação de identificação de tigeciclina baseada nas suas características estruturais.
- Avaliar a faixa de fusão de tigeciclina substância química de referência (SQR).
- Realizar análise térmica de tigeciclina-SQR e tigeciclina pó liofilizado pelas técnicas de termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial.
- Desenvolver método por cromatografia em camada delgada (CCD) para identificação de tigeciclina em pó liofilizado e seus produtos de degradação.
- Desenvolver método por espectrofotometria na região ultravioleta (UV), visível (VIS) e na região de infravermelho (IV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para identificação de tigeciclina em pó liofilizado.
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região UV e VIS para determinação quantitativa de tigeciclina em pó liofilizado.
- Desenvolver e validar método por CLAE para análise quantitativa de tigeciclina em pó liofilizado e seus produtos de degradação.
- Desenvolver e validar métodos microbiológicos por difusão em ágar e por turbidimetria para avaliação de potência de tigeciclina em pó liofilizado.
- Realizar análise comparativa dos métodos quantitativos desenvolvidos e validados para análise de tigeciclina em pó liofilizado.
- Realizar estudo de estabilidade de tigeciclina avaliando as amostras pelas técnicas desenvolvidas e validadas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

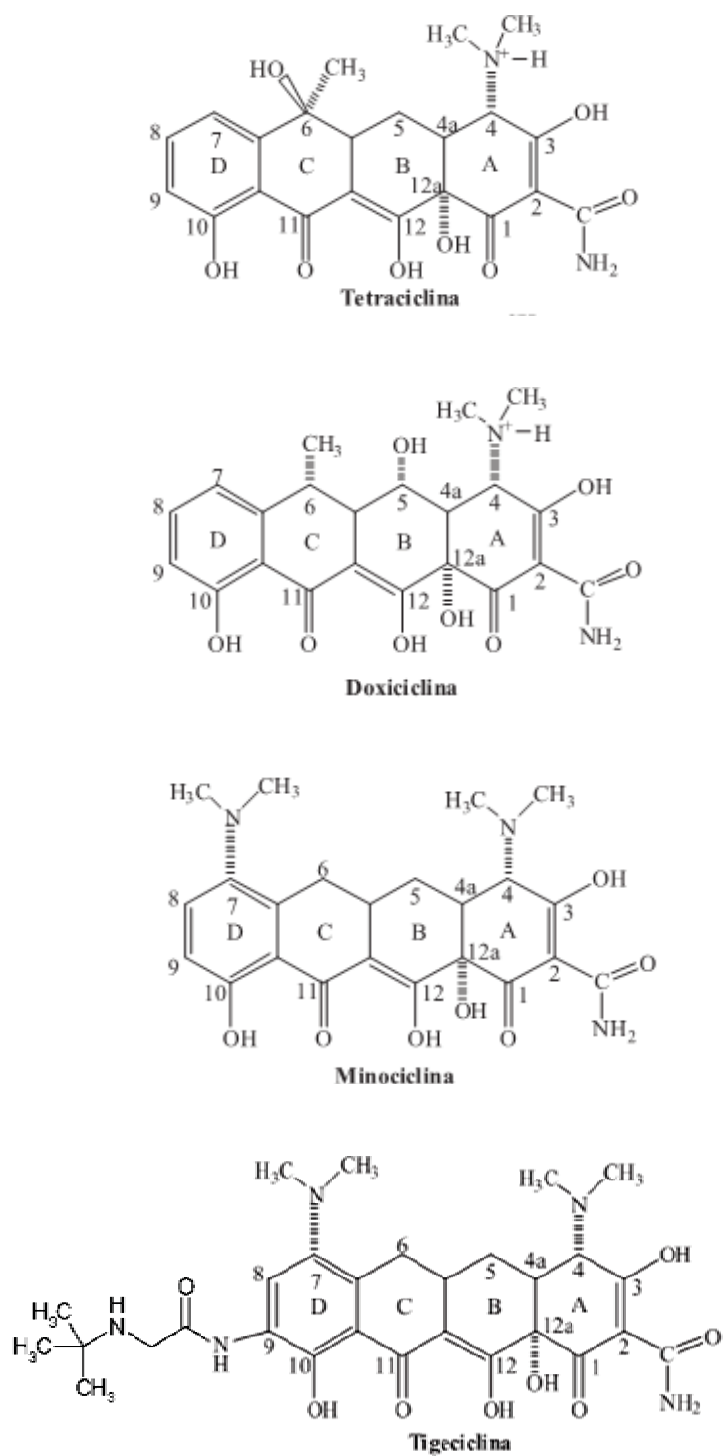
3.1 Tetraciclinas

As tetraciclinas são um grupo de antimicrobianos cujo protótipo, a clortetraciclina, surgiu em 1948, tornando-se conhecidas pelo amplo espectro devido à atividade contra *Rickettsia*, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas e *Chlamydia*. Os fármacos pertencentes a este grupo são análogos estruturais que apresentam o composto naftacenocarboxamida policíclico (OKA et al., 2000). A estrutura geral e a configuração absoluta estão representadas na Figura 3.1. A configuração absoluta natural do átomo de carbono C4 é requisito essencial para a ação farmacológica das tetraciclinas. A presença do grupamento amida em C2 é também considerada como aspecto estrutural necessário para a ação biológica das tetraciclinas. Outra observação importante relacionada ao aumento da potência inibitória enzimática foi a ausência dos grupos metila e hidroxila na posição C6. Atualmente, novos aspectos que versam sobre a relação estrutura e atividade têm surgido. Sabe-se que a manutenção do núcleo tetracíclico (anéis A, B, C e D), a influência dos substituintes nas posições C7, C8 e C9, a conservação do sistema cetoenólico (posições C11, C12 e C12a) e a configuração α nas posições 4a e 12a são essenciais para a manutenção da atividade farmacológica das tetraciclinas e, neste aspecto, a estrutura da 6-desoxi-6-desmetiltetraciclina pode ser considerada uma estrutura mínima para a manutenção da atividade farmacológica das tetraciclinas (PEREIRA-MAIA et al., 2010).

Além da importância farmacológica, as tetraciclinas possuem uma estrutura química muito interessante, podendo formar quelatos em várias posições da molécula devido à presença de vários grupos doadores (N, O). Os sítios de coordenação incluem os oxigênios em C10-C12, o oxigênio enólico em C3 e os nitrogênios em C4 e no grupo amida do anel A. A tetraciclina possui três prótons dissociáveis, um no grupo enol em C3, outro no sistema cetofenólico em C10-C12 e outro no grupo dimetilamônio em C4, com valores de pKa 3,5; 7,7 e 9,3, respectivamente (DUARTE et al., 1999; CHARTONE-SOUZA et al., 2005).

Figura 3.1. Estruturas das principais tetraciclinas usadas na clínica médica.

Fonte: PEREIRA-MAIA et al., 2010



As tetraciclinas são antimicrobianos bacteriostáticos, que inibem a síntese de proteínas bacterianas através de sua ligação ao ribossomo bacteriano 30S, impedindo o acesso do aminoacil-tRNA ao local aceptor (A) no complexo mRNA-ribossomo. A resistência a estes fármacos é mediada primariamente por plasmídios e, com frequência, é induzível. Os três principais mecanismos de resistência são: (1) diminuição do acúmulo de tetraciclinas, em consequência de uma redução do influxo de antibiótico ou da aquisição de uma via de efluxo dependente de energia; (2) produção de uma proteína de proteção ribossômica, que desloca a tetraciclina de seu alvo, uma “proteção” que também pode ocorrer por mutação, e (3) inativação enzimática (BRUNTON et al., 2006).

As glicilciclinas são análogos sintéticos das tetraciclinas, exibindo atividades antibacterianas típicas das tetraciclinas e também contra micro-organismos resistentes a esta classe, que apresentam genes responsáveis pelos mecanismos de efluxo e proteção ribossômica. A tigeciclina é a primeira glicilciclina aprovada, caracterizando-se por ser um antimicrobiano potente, com amplo espectro de ação. Sua estrutura é semelhante à da minociclina, com adição de uma cadeia glicilamido na posição 9, a qual é responsável pela atividade contra patógenos resistentes (BRADFORD, 2004).

3.2 Mecanismo de ação

A tigeciclina apresenta ação bacteriostática *in vitro*, ligando-se reversivelmente à região helicoidal (H34) na subunidade 30S do ribossomo bacteriano. Com afinidade cinco vezes maior que as tetraciclinas, a tigeciclina bloqueia a entrada de RNA aminoacil transferase no sítio de ligação A do ribossomo (BERGERON et al., 1996). A formação das ligações peptídicas é impedida uma vez que não há mais incorporação de novos resíduos de aminoácidos à cadeia, resultando em total inibição da síntese proteica (ZHANEL et al., 2004).

3.3 Mecanismos de resistência

O fenômeno de resistência bacteriana a antimicrobianos tem complicado a terapia de doenças infecciosas, representando ameaça à saúde pública. A prevalência de bactérias resistentes provoca aumento no uso de terapias combinadas, nas quais dois ou três agentes antimicrobianos são associados no período inicial de tratamento, apresentando desvantagens relacionadas ao custo,

número de administrações e elevação dos riscos de reações adversas e interações medicamentosas (ROSSI e ANDREAZZI, 2006).

Whittem e Gaon (1998) relatam que, em condições normais, a frequência de mutação em uma população bacteriana é de 1 organismo em 1 milhão, sendo influenciada pelo uso abusivo de antimicrobianos e diretamente correlacionada com a concentração inibitória mínima (CIM) do fármaco em seu sítio de ação, enfatizando-se a importância das dosagens apropriadas. Nesse sentido, o desenvolvimento de novos fármacos com amplo espectro de ação, capazes de contornar os mecanismos de resistência, juntamente com o estudo de metodologia analítica que assegure a qualidade desses produtos, representa importante avanço na prática clínica.

A resistência às tetraciclinas resulta primariamente da aquisição de genes móveis *tet* (resistência à tetraciclina) e *otr* (resistência à oxitetraciclina). A expressão destes genes leva à produção de proteínas que contribuem para os dois maiores mecanismos de resistência: proteção ribossomal, através da dissociação das tetraciclinas de seus sítios de ligação e bomba de efluxo, através do transporte ativo do fármaco para fora da célula bacteriana (CHOPRA e ROBERTS, 2001; CHOPRA, 2002; DOAN et al., 2006). Aparentemente, o aumento da afinidade de ligação apresentado pela tigeciclina é resultado da substituição no carbono 9 das tetraciclinas, a qual é responsável por superar o mecanismo de proteção ribossomal (ZHANEL et al., 2004; DOAN et al., 2006). A presença da cadeia lateral nesta posição também confere impedimento estérico, bloqueando o gene de efluxo *tet* de exportar tigeciclina para fora da célula bacteriana (CHOPRA, 2002). Entretanto, o mecanismo exato de contorno da resistência não é ainda bem esclarecido.

Mecanismos de resistência à tigeciclina não estão bem definidos, uma vez que este fármaco encontra-se disponível por tempo inferior ao de outras classes de antimicrobianos. A tigeciclina possui um único mecanismo de atividade que afeta várias classes de patógenos, reduzindo o risco de seleção de patógenos resistentes em comparação com outras classes de antimicrobianos. Além disso, poderá ocorrer menor incidência de resistência devido ao uso de tigeciclina em esquema de monoterapia, evitando assim o uso da combinação de dois ou três fármacos, o que aumenta as chances de resistência. Adicionais experiências com tigeciclina precisam ser adquiridas para confirmação de seu baixo potencial de seleção de micro-organismos resistentes (WILCOX, 2009).

Em estudo publicado recentemente, é relatado o primeiro mecanismo de resistência à tigeciclina. Uma enzima *tetX* monoxigenase dependente de flavina confere resistência a todas as tetraciclinas clinicamente importantes, incluindo a tigeciclina. Esta enzima catalisa hidroxilação região-seletiva de tetraciclinas para 11a-hidroxi-tetraciclinas, causando redução significativa das

propriedades antimicrobianas. Foi salientado que este mecanismo ainda não foi observado clinicamente e que esta é a primeira vez que detalhes estruturais são disponíveis antes da real ocorrência do problema (VOLKERS et al., 2011).

3.4 Espectro de ação

A tigeciclina possui atividade antibacteriana potente contra amplo espectro de organismos Gram-positivos, Gram-negativos e anaeróbicos, incluindo patógenos multifármacos resistentes (GALES e JONES, 2000; DOAN et al., 2006; BHATTACHARYA et al., 2009).

Atividade antibiótica contra Gram-positivos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes* tem sido observada (BHATTACHARYA et al., 2009). Outros organismos Gram-positivos menos comuns como *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Listeria monocytogenes* também demonstraram suscetibilidade à tigeciclina (BOUCHER et al., 2000; BIEDENBACH et al., 2001). Além disso, cepas suscetíveis e resistentes às tetraciclinas têm apresentado valores de concentração inibitória mínima (CIM) para tigeciclina quase idênticos. Alguns valores de CIM podem ser mais altos que os registrados, pois a tigeciclina requer meios de cultura recém-preparados para que os testes de CIM sejam exatos (BRADFORD et al., 2005b; STEIN e CRAIG, 2006).

Patógenos Gram-negativos como *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas hydrophilia*, *Pasteurella multocida*, *Serratia marcescens* e *Enterobacter aerogenes* têm também apresentado suscetibilidade à tigeciclina. Valores de CIM baixos para tigeciclina têm sido observados em patógenos do trato respiratório como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* (STEIN e CRAIG, 2006).

A tigeciclina é altamente ativa contra *Neisseria gonorrhoeae*, *Eikenella corrodens* e micobactérias de rápido crescimento como *Mycobacterium chelonae*, *M. abscessus* e *M. fortuitum*, os quais possuem valores de CIM altos para minociclina (NOSKIN, 2005). Além disso, este fármaco tem apresentado atividade contra outros patógenos anaeróbicos como *Bacteriodes* spp., *Clostridium perfringes*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum* e *Bacteroides vulgatus* (BRADFORD et al., 2005a; BHATTACHARYA et al., 2009).

Talvez a característica mais potencialmente significativa da tigeciclina é sua ação contra patógenos multifármacos resistentes como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistentes à vancomicina, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina, micro-organismos resistentes às tetraciclina, aminoglicosídeos, carbapenênicos e fluorquinolonas e *Enterobacteriaceae* produtora de betalactamases e Amp C betalactamases de amplo espectro. Em contraponto, a tigeciclina tem limitada ou não apresenta ação contra cepas de *Burkholderia cepacia*, *Proteus mirabilis*, *Providencia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Stenotrophomonas maltophilia* (PATEL et al., 2000; GARRISON et al., 2005; PILLAR et al., 2008).

A atividade *in vitro* da tigeciclina em combinação com outros fármacos tem sido estudada (ENTENZA e MOREILLON, 2009). Estudos observaram a ausência de antagonismo ou sinergia com amicacina, ampicilina/sulbactam, azitromicina, ciprofloxacino, colistina, imipenem, levofloxacino, piperaciclina, piperaciclina/tazobactam, polimixina B, quinupristina/dalfopristina, rifampicina, minociclina e vancomicina (PATEL et al., 2000; PETERSEN et al., 2006). Entretanto, a combinação de tigeciclina e arbecacina para *E. faecalis* resultou em antagonismo *in vitro* (LAPLANTE et al., 2006).

Salvatore e colaboradores (2009) investigaram o efeito da tigeciclina nos parâmetros microbiológicos, histológicos e imunológicos em modelo murino de pneumonia causada por *Mycoplasma pneumoniae*. Foi demonstrado efeito significativo da tigeciclina na inflamação pulmonar, com decréscimo de citocinas inflamatórias e reestruturação do tecido pulmonar.

A atividade da tigeciclina também foi avaliada em estudos *in vitro* com *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à meticilina, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados em estudo clínico. Todos os micro-organismos apresentaram concentração inibitória mínima de tigeciclina requerida para inibir 90% dos isolados (CIM 90) entre 0,06–0,5 µg/mL. Neste estudo, a tigeciclina demonstrou-se eficaz e apresentou farmacocinética favorável em pacientes hospitalizados com infecções complicadas de pele e tecidos moles (POSTIER et al., 2004).

Fritsche e colaboradores (2004) avaliaram 11.859 amostras de bactérias, isoladas de pacientes de 29 países, quanto à sua suscetibilidade à tigeciclina, entre os anos de 2000-2002. Os pacientes apresentavam o diagnóstico de infecções do trato respiratório (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas) e infecções complicadas de pele e tecidos moles (bactérias Gram-positivas).

Entre os micro-organismos, contra os quais a potência de tigeciclina foi demonstrada, destacam-se *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à oxacilina (CIM 90 = 0,5 µg/mL), *Streptococcus pneumoniae* sensíveis e resistentes à penicilina (CIM 90 ≤ 0,25 µg/mL), *Enterococcus* spp. sensíveis e resistentes à vancomicina (CIM 90 = 0,25–0,5 µg/mL), *Haemophilus influenzae* betalactamase negativos e positivos (CIM 90 = 1 µg/mL), *Moraxella catarrhalis* (CIM 90 = 0,25 µg/mL) e *Neisseria meningitidis* (CIM 90 ≤ 0,12 µg/mL). Todas as cepas foram inibidas com concentração de tigeciclina ≤ 2 µg/mL, sem diferença observada entre bactérias resistentes à tetraciclina e à doxiciclina. Os autores concluíram que a tigeciclina representa uma opção atrativa para uso clínico em infecções do trato respiratório e infecções de pele e tecidos moles.

Casal e colaboradores (2009) compararam o perfil de atividade de tigeciclina contra *Acinetobacter* spp. determinado por método de difusão em ágar e microdiluição em caldo. Os resultados demonstraram que o método por difusão é menos sensível que o de microdiluição para cepas com CIM ≥ 2 mg/mL, sugerindo cautela com resultados falso-resistentes. Do mesmo modo, Liao e colaboradores (2008) avaliaram a atividade de tigeciclina contra *Acinetobacter baumannii*, determinando CIM e diâmetro da zona inibitória para métodos de microdiluição e difusão, respectivamente. As CIM foram interpretadas de acordo com limites estabelecidos pelo FDA (suscetível ≤ 2 µg/mL e resistente ≥ 8 µg/mL). Os diâmetros foram avaliados de acordo com Jones (2001) (suscetível ≥ 16 mm e resistente ≤ 12 mm) e FDA (suscetível ≥ 19 mm e resistente ≤ 14 mm). Os autores sugerem a utilização do método por microdiluição para testes com *A. baumannii*, devido à baixa correlação apresentada entre os diferentes métodos. Em trabalho similar, Pillar e colaboradores (2008) realizaram estudo com vários micro-organismos, concluindo que diferenças entre métodos não ocorrem com outros patógenos e especial atenção deve ser dada a *S. marcescens*, *Acinetobacter* spp. e *S. pneumoniae*.

3.5 Farmacocinética

A administração de tigeciclina se dá por infusão intravenosa. A concentração plasmática máxima (C_{máx}) obtida em 103 voluntários sadios que receberam dose de 100 mg de tigeciclina seguida de 50 mg a cada 12 horas foi 0,87 µg/mL. A área sob a curva (AUC₀₋₁₂) concentração plasmática x tempo (0 - 12 horas) foi 2,35 µg.h/mL (TOWNSEND et al., 2006). Estudos *in vitro* de concentração plasmática de tigeciclina (0,1-1,0 µg/mL) têm mostrado que este fármaco possui

alta ligação às proteínas (71-87%), elevado volume de distribuição (500-700 L, 7-9 L/kg), indicando extensiva distribuição tecidual (TOWNSEND et al., 2006; KASBEKAR, 2006).

Em pacientes submetidos a cirurgias (n = 54), as concentrações de tigeciclina foram determinadas quatro horas após a administração de uma dose única de 100 mg. A relação tecido/soro de concentração de tigeciclina foi 38 na vesícula biliar, 8,6 no pulmão, 2,1 no cólon, 0,35 em ossos e 0,58 no líquido sinovial (TOWNSEND et al., 2006).

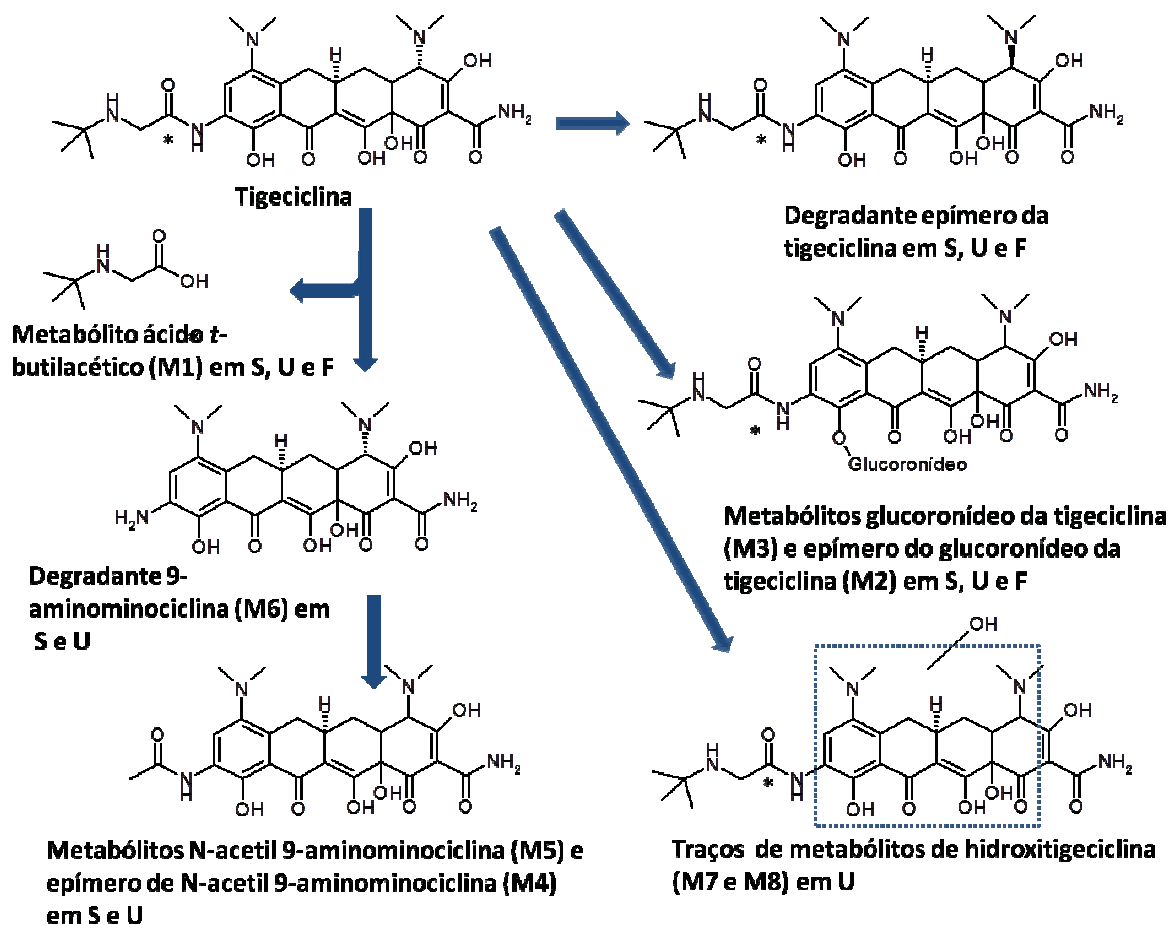
A penetração de tigeciclina nas meninges não-inflamadas variou de 33 a 52% da concentração do soro, com a relação mais alta da concentração líquido cérebro-espinhal/soro ocorrendo 24 horas após a administração da dose (RODVOLD et al., 2006). A AUC₀₋₁₂ de tigeciclina no fluido da membrana epitelial pulmonar de voluntários sadios foi 32% mais alta que a AUC₀₋₁₂ no soro (SUN et al., 2005). Por outro lado, a concentração de tigeciclina em macrófagos alveolares de voluntários sadios foi 78 vezes mais alta que aquelas encontradas no soro. Similarmente, em neutrófilos as concentrações de tigeciclina têm sido 20-30 vezes mais altas que as concentrações extracelulares (MEAGHER et al., 2005).

Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos de tigeciclina foram determinados em soro e pulmões, após administração intravenosa em 30 voluntários. As concentrações do fármaco no soro, fluido da membrana epitelial pulmonar e células alveolares foram determinadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. O C_{max}, AUC e meia-vida foram 0,72 µg/mL, 1,73 µg.h/mL e 15 h em soro, 0,37 µg/mL, 2,28 µg.h/mL e 39,1 h em fluido pulmonar e 15,2 µg/mL, 134 µg.h/mL e 23,7 h em células alveolares. As altas concentrações intracelulares nos alvéolos pulmonares sugerem que a tigeciclina pode também ser utilizada no tratamento de infecções respiratórias causadas por patógenos sensíveis como *Legionella*, *Listeria* ou *Mycobacteria* (CONTE Jr et al., 2005).

As rotas metabólicas e de excreção de tigeciclina têm sido amplamente estudadas em humanos e animais usando tigeciclina marcada [Carbono 14] (HOFFMANN et al., 2007; MEAGHER et al., 2005). Em estudos com humanos, após administração de uma dose de 100 mg de tigeciclina seguida por cinco doses de 50 mg e, após, por uma dose única marcada com carbono 14, observou-se que 59% da dose radioativa foi excretada nas fezes e 32% na urina. Tigeciclina não alterada foi o componente predominante em cada matriz. Metabólitos conjugados de tigeciclina e seu epímero foram os principais constituintes detectados no soro humano (Figura 3.2), correspondendo 5-20% da radioatividade do soro e 4 e 5% da dose excretada como conjugada em urina e fezes. A epimerização da tigeciclina em C₄ ocorre por via não-enzimática

produzindo componente farmacologicamente inativo. Embora a excreção ocorra primariamente na forma de fármaco não alterado, duas principais rotas metabólicas foram identificadas, glucuronidação do precursor ao seu epímero (metabólitos M3 e M2) e hidrólise da amida da cadeia lateral *t*-butilaminoacetil amino (metabólitos M1 e M5). M5 é metabolizado via acetilação para os metabólitos M4 e M6 (HOFFMANN et al., 2007; MACGOWAN, 2008). A tigeciclina não afeta o sistema enzimático P450 e, desta forma, seu uso concomitante com outras substâncias apresenta baixo potencial de interação (STEIN e CRAIG, 2006; KASBEKAR, 2006). Ajuste de dose não se mostrou necessário, baseado no gênero, idade, raça, função renal e disfunção hepática moderada. Porém, em pacientes com disfunção hepática severa, a dose deve ser reduzida para 50% (DOAN et al., 2006).

Figura 3.2. Compostos relacionados da tigeciclina detectados em soro humano (S), urina (U) e fezes (F). * indica o sítio de ligação do carbono 14. Fonte: HOFFMANN et al., 2007



3.6 Efeitos adversos e interações

Dados reportando efeitos adversos associados ao uso de tigeciclina ou interação com outros fármacos são limitados. Estudos clínicos sugerem que a tigeciclina é geralmente bem tolerada e segura ao usuário. Os efeitos adversos mais comuns durante o tratamento são náuseas, vômitos e dores de cabeça (ZHANEL et al., 2004; POSTIER et al., 2004; LOPES, 2006; PETERSON, 2008).

Quanto às interações medicamentosas, foi relatado decréscimo na eliminação da varfarina, mas os dados disponíveis não sugerem que isso resulte em significantes mudanças nos parâmetros hematológicos de coagulação. Entretanto, como a tigeciclina pode prolongar os tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada, testes de coagulação devem ser realizados regularmente quando varfarina e tigeciclina são administrados concomitantemente. Precauções também devem ser tomadas com contraceptivos orais, os quais podem sofrer alterações de atividade (HYLANDS, 2008).

3.7 Aplicações clínicas

A tigeciclina é indicada para tratamento de infecções de pele e tecidos moles complicadas (definidas como de etiologia polimicrobiana, com necessidade de intervenção cirúrgica e envolvimento de tecido mole profundo suspeito ou confirmado), não sendo indicada para infecções de pé diabético. Estudos demonstraram atividade não inferior da tigeciclina quando comparada à combinação vancomicina-aztreonam no tratamento de infecções complicadas de pele e tecidos moles (BREEDT et al., 2005; SACCHIDANAND et al., 2005; ELLIS-GROSSE et al., 2005; BHATTACHARYA et al., 2009). Além disso, a tigeciclina é também indicada para o tratamento de infecções intra-abdominais complicadas (definidas pela necessidade de cirurgia para abscessos intra-abdominal ou peritonite associada a abscessos ou perfuração). A tigeciclina foi tão eficaz quanto imipenem/cilastatina no tratamento de infecções intra-abdominais complicadas (FOMIN et al., 2005; OLIVA et al., 2005).

Estudos com tigeciclina sugerem que este fármaco oferece vantagens devido à atividade contra patógenos resistentes, eliminando a necessidade de uso de terapia combinada no tratamento empírico de infecções complicadas de pele e tecidos moles. Não existem evidências que a associação de betalactâmicos e aminoglicosídeos seja mais efetiva que a utilização de tigeciclina e,

além disso, o risco de nefrotoxicidade é maior. Outra vantagem é a possibilidade de uso em pacientes com hipersensibilidade a betalactâmicos (NATHWANI, 2009).

3.8 Métodos analíticos

A determinação de fármacos é uma tarefa multidisciplinar. Durante o processo de fabricação do fármaco e sua formulação há a necessidade de métodos analíticos capazes de detectar produtos de degradação conhecidos e desconhecidos para adequado controle de qualidade. Métodos bioanalíticos são necessários em estudos clínicos, monitoramento terapêutico do fármaco e ajuste de esquema de dose individual (NOVÁKOVÁ et al., 2008). Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) associada a diferentes tipos de detecção - UV (ultravioleta), FD (fluorescência) e MS (espectrometria de massas) - tem representado o método de escolha para desenvolvimento de métodos bioanalíticos (RAO et al., 2005). Existem poucos métodos bioanalíticos descritos para análise de tigeciclina e seus metabólitos. Análise deste fármaco em produtos farmacêuticos e avaliação de seus produtos de degradação não foram encontradas na literatura.

Cinco métodos de CLAE-UV para determinação de tigeciclina em material biológico foram encontrados na literatura, os quais estão descritos a seguir. Os métodos, em geral, utilizam fase estacionária C18 e uma combinação de acetonitrila e tampão (acetato de amônio ou fosfato). Eluições em modo gradiente e isocrática foram utilizadas.

Li e colaboradores (2004) publicaram estudo com determinação de concentrações de tigeciclina em solução salina balanceada de Hank's, neutrófilos polimorfonucleares e soro humano. O padrão interno utilizado foi cloridrato de minociclina e o limite de quantificação de tigeciclina foi 0,05 µg/mL. Outro método de CLAE foi usado por Bradford e colaboradores (2005b) para determinar se a quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultura de teste está relacionada com a variabilidade dos valores de CIM de tigeciclina. Os autores realizaram a comparação da estabilidade de tigeciclina em água destilada, caldo Mueller Hinton II recém preparado e após horas de preparo na presença e ausência do reagente biocatalítico oxi-redutor oxidase. O procedimento analítico usou eluição em gradiente da fase móvel composta de tampão acetato de amônio e acetonitrila e detecção com detector de arranjo de diodos (UV-Vis). Os cromatogramas foram registrados em 259, 292 e 416 nm.

A segurança, tolerabilidade e farmacocinética da tigeciclina após administração de doses intravenosas únicas e múltiplas em voluntários sadios foi descrita. O fármaco foi avaliado em soro

e urina utilizando método por CLAE, com faixa de concentração de 25 a 12500 ng/mL para soro. Em urina o limite de detecção de tigeciclina foi 2 µg/mL (MURALIDHARAN et al., 2005).

O perfil metabólico de tigeciclina foi avaliado por método de CLAE-UV usando duas fases móveis em gradiente linear. Adicionais condições de CLAE foram usadas para caracterizar os metabólitos polares que não ficaram retidos em coluna cromatográfica C18. As separações foram realizadas em coluna Waters Atlantis HILIC Silica usando duas fases móveis, ácido trifluoracético (TFA) em acetonitrila e TFA em água (HOFFMANN et al., 2007).

Zorpas e colaboradores (2011) desenvolveram e validaram método por CLAE-UV para determinação de tigeciclina em plasma de coelho. Minocilina foi utilizada como padrão interno. Coluna C18 e fase móvel composta por tampão fosfato pH 7,0 e acetonitrila foram utilizadas. Os limites de quantificação e detecção estimados foram 21 e 7 ng/mL, respectivamente. O método foi aplicado para determinação do perfil farmacocinético da tigeciclina em coelhos.

Métodos de CLAE/MS/MS têm sido empregados para determinação de tigeciclina em fluidos biológicos e tecidos. Foram encontrados seis métodos na literatura para avaliação de tigeciclina em matrizes biológicas. A segurança e tolerabilidade de tigeciclina administrada em indivíduos sadios em diferentes taxas de infusão e volumes foram documentadas por Muralidharan e colaboradores (2005). A concentração de tigeciclina em soro foi quantificada usando metodologia validada. Os limites de quantificação inferior e superior foram 10 ng/mL e 2000 ng/mL, respectivamente. Hoffmann e colaboradores (2007) também empregaram detecção por espectrometria de massas para determinação de tigeciclina em soro e urina. O estudo foi conduzido para avaliar a farmacocinética, disposição metabólica e balanço de massas de uma dose intravenosa de 50 mg de tigeciclina marcada com carbono 14 em voluntários sadios do sexo masculino. Em soro, o ensaio foi validado para faixa de concentração entre 10-2000 ng/mL, utilizando coluna C18 e padrão interno [*t*-butil-d9] tigeciclina. Em urina, o ensaio foi validado para concentrações entre 0,20 e 80 µg/mL.

A tigeciclina possui grande volume de distribuição, com extensiva distribuição nos tecidos e sua determinação nestas amostras tem sido realizada por métodos de CLAE/MS/MS. Assim, um método de CLAE/MS/MS específico e sensível foi utilizado para quantificar tigeciclina em soro, lavados brônquicos e broncoalveolar e em células alveolares. Tigeciclina e o padrão interno [*t*-butil-d9] tigeciclina foram eluídos em coluna de fase reversa C8 com tempo de corrida total de 3,0 minutos (CONTE Jr et al., 2005).

Adicionalmente, as concentrações de tigeciclina em soro e em correspondentes tecidos como vesícula biliar, bile, cólon, ossos, líquido sinovial e pulmões foram estudadas, em tempos selecionados, após administração de dose única intravenosa de 100 mg de tigeciclina em indivíduos submetidos a cirurgias ou procedimentos médicos. O método de CLAE/MS/MS utilizou coluna C18 e fase móvel composta de água, acetonitrila, metanol e ácido trifluoracético. A faixa de concentração da curva analítica foi adaptada para diferentes amostras (RODVOLD et al., 2006). Similarmente, Ji e colaboradores (2007) desenvolveram ensaio sensível por CLAE/MS/MS para determinação de tigeciclina em ossos de ratos, o qual empregou coluna C18 e solvente de extração fortemente ácido, obtendo-se alta recuperação do fármaco nessa matriz. Após, usando metodologia similar, levemente modificada pela adição de agente estabilizante nas amostras, um ensaio adicional para ossos humanos foi desenvolvido e validado (JI et al., 2008). Esse mesmo grupo de pesquisadores desenvolveu método analítico por CLAE/MS/MS para determinação de tigeciclina em pele humana, utilizando metanol fortemente acidificado como solvente de extração. As concentrações de tigeciclina determinadas nas amostras foram de 185 a 2853 ng/g (JI et al., 2010).

3.9 Validação de métodos analíticos

Os avanços recentes na área farmacêutica viabilizaram a produção de novos fármacos, que necessitam de métodos analíticos para sua determinação quantitativa em produtos farmacêuticos. O desenvolvimento de métodos que permitam quantificar fármacos em matérias-primas e produtos acabados é fundamental para o controle de qualidade desses produtos no âmbito da indústria farmacêutica nacional e internacional. A escolha do procedimento baseia-se em vários fatores, que incluem a estrutura e características do fármaco, pureza, quantidade de amostra e finalidade da análise, bem como a disponibilidade de equipamentos e reagentes. O desenvolvimento de métodos envolve a avaliação e otimização de condições, incluindo etapas de preparação da amostra, detecção e quantificação. A escolha do método deve levar em consideração fatores como sua adequação à substância analisada em determinada forma farmacêutica e condições como disponibilidade de instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, simplicidade e baixo risco ocupacional e ambiental. Posteriormente, a validação é necessária para demonstrar, por meio

de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos.

Nesse contexto, a ANVISA, de acordo com a resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, divulgou aspectos relacionados à validação de métodos analíticos (BRASIL, 2003). Os parâmetros fundamentais de avaliação incluem especificidade, linearidade, exatidão, precisão, robustez, limites de quantificação e detecção e teste de adequabilidade do sistema (ERMER, 2001; SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004; ICH, 2005; SHABIR et al., 2007; USP 33, 2010; CHAN, 2011; HAECKEL e SONNTAG, 2012; BONFILIO et al., 2012).

A especificidade do método analítico indica sua capacidade de diferenciar e quantificar o analito, na presença de outros constituintes da amostra que inclusive poderiam interferir na sua determinação, como adjuvantes, impurezas, produtos de degradação ou mesmo outra substância ativa. A linearidade corresponde à capacidade do método analítico para demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da substância sob análise.

A precisão representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. É determinada pela repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade é efetuada por meio de várias análises, nas mesmas condições em curto intervalo de tempo. Esta determinação deve ser feita a partir de, no mínimo, seis determinações na concentração estabelecida correspondente a 100%. A precisão intermediária expressa o efeito das variações devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de estudo colaborativo. A precisão normalmente é expressa através de Desvio Padrão Relativo percentual (DPR %).

A exatidão descreve a proximidade dos resultados médios fornecidos pelo método em relação ao valor teórico. Pode ser determinada através do ensaio de quantidade conhecida da substância sob análise adicionada em meio preparado com excipientes da formulação ou em solução da amostra de produto farmacêutico.

O limite de detecção corresponde à menor concentração da substância em análise que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade, porém não necessariamente quantificada com valor exato, utilizando o procedimento experimental.

O limite de quantificação representa a menor concentração de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis.

A robustez descreve a reprodutibilidade do método analítico, frente a pequenas variações nas condições experimentais, como por exemplo: proporção e pH da fase móvel, temperatura, comprimento de onda, estabilidade da solução analítica, entre outros.

O teste de adequabilidade do sistema consiste na verificação da resolução e reprodutibilidade do procedimento analítico, devendo ser realizado através da análise de parâmetros como simetria, fator de capacidade, pratos teóricos, resolução, área e tempo de retenção.

Desse modo, estes parâmetros demonstram que o método é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (SWARTZ e KRULL, 1998; SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004; USP 33, 2010; CHAN, 2011).

O desenvolvimento e validação de métodos analíticos aplicáveis para estudos de estabilidade são recomendados para avaliação de formulações farmacêuticas durante seu desenvolvimento e controle de qualidade (BAKSHI e SINGH, 2002). Nesse contexto, estudos forçados de degradação e de especificidade devem ser realizados, a fim de demonstrar a capacidade e garantir a adequabilidade do procedimento analítico. Recomenda-se a obtenção dos prováveis produtos de degradação através da avaliação da suscetibilidade da molécula sob estudo a condições de estresse como temperaturas elevadas, oxidações, fotólises e hidrólises em ampla faixa de pH (ICH, 2003; SHABIR et al., 2007).

DESCRIÇÃO

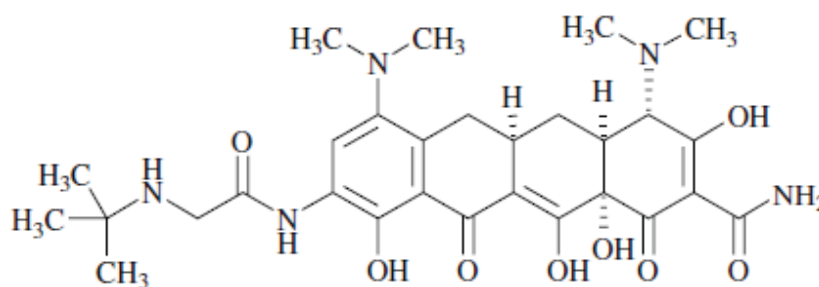
4. DESCRIÇÃO

4.1 Descrição geral

Quimicamente, a tigeciclina é (4*S*,4*aS*,5*aR*,12*aS*)-9-[2-(*terc*-butilamina)acetamida]-4,7-bis(dimetilamina)-1,4,4*a*,5,5*a*,6,11,12*a*-octaidro-3,10,12,12*a*-tetraidroxi-1,11-dioxo-2-naftaceno-carboxamida. Apresenta registros número 220620-09-7, no *Chemical Abstracts Service* (CAS), e número 09535, na Denominação Comum Brasileira (DCB). A tigeciclina é descrita como um pó cristalino alaranjado, com fórmula empírica $C_{29}H_{39}N_5O_8$ e massa molecular de 585,65 g/mol (CONTE Jr. et al., 2005; O'NEIL, 2006; DOAN et al., 2006; STEIN e CRAIG, 2006; TOWNSEND et al., 2006; JI et al., 2008; PETERSON, 2008). De acordo com informações da base de dados SciFinder[®], os valores de pKas, calculados pelo *Advanced Chemistry Development* (ACD/Labs) Software V11.02, foram $4,50 \pm 1,00$ e $11,05 \pm 0,70$. A estrutura química da tigeciclina está representada na Figura 4.1.1.

Figura 4.1.1. Estrutura química da tigeciclina (CAS: 220620-09-7)

Fonte: LIVERMORE, 2005



A tigeciclina, Tygacil[®], é comercializada no Brasil pela Wyeth Indústria Farmacêutica, com registro no Ministério da Saúde concedido em 3 de outubro de 2005. O produto é vendido na apresentação de cartucho com 10 frascos-ampola contendo 50 mg de tigeciclina, na forma farmacêutica de pó liofilizado. É indicado para o tratamento de infecções complicadas da pele e tecidos moles e infecções intra-abdominais.

4.2 Substância Química de Referência (SQR)

Foi utilizada tigeciclina SQR com teor especificado de 98,80% e identificada pelo número de controle 0904012356t, adquirida da empresa *Sequoia Research Products* (Pangbourne, Reino Unido).

4.3 Forma Farmacêutica

Foram utilizadas amostras de pó liofilizado, frascos-ampola contendo 50 mg de tigeciclina, sob números de lote E60464 e C65323 com o nome comercial de Tygacil[®], Laboratório Wyeth, adquiridas comercialmente. Cada frasco de pó liofilizado contém: 53 mg de tigeciclina e 100 mg de lactose monoidratada.

ANÁLISE QUALITATIVA

5. ANÁLISE QUALITATIVA

5.1 *CARACTERÍSTICAS FÍSICAS*

5.1.1 Método

A tigeciclina SQR descrita no item 4.2 foi avaliada visualmente em relação ao aspecto, cor e odor.

5.1.2 Resultados

A tigeciclina apresentou-se sob a forma de pó alaranjado inodoro. A descrição está de acordo com a citada pelo fabricante.

5.2 *REAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO*

Considerando a estrutura química da tigeciclina, representada na Figura 4.1.1, como representante das glicilciclinas, as quais são derivadas estruturalmente das tetraciclinas, realizou-se a reação preconizada nos compêndios oficiais para identificação das tetraciclinas na caracterização estrutural do fármaco.

5.2.1 Método

A Farmacopeia Britânica (BP, 2010) preconiza, como método de identificação de cloridratos de minociclina e tetraciclina, reação de 2,0 mg de fármaco com 5 mL de ácido sulfúrico, gerando coloração amarela brilhante (cloridrato de minociclina) ou violeta avermelhada (cloridrato de tetraciclina). Após, adicionando 2,5 mL de água, a cor torna-se amarelo pálido (cloridrato de minociclina) ou amarelo (cloridrato de tetraciclina).

5.2.2 Resultados

A tigeciclina é relacionada estruturalmente com a minociclina, sendo a diferença apenas o radical glicilamido no carbono da posição 9 presente na estrutura da tigeciclina. Conforme esperado, a tigeciclina comporta-se como o cloridrato minociclina, observando-se coloração amarela brilhante após reação com ácido sulfúrico.

5.3 DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE FUSÃO

A faixa de fusão pode ser empregada na caracterização de um composto, sendo ainda um importante indicativo de pureza, quando comparado com padrões de referência, pois uma pequena quantidade de impureza pode causar diminuição do ponto de fusão ou alargar a faixa de fusão de um determinado composto (GRAHAM, 1995).

5.3.1 Método

A faixa de fusão foi determinada na substância de referência, descrita no item 4.2, utilizando equipamento automático Stuart Scientific SMP3 (Staffordshire, Reino Unido). O fármaco foi colocado em tubos capilares com 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento que foram introduzidos no equipamento.

5.3.2 Resultados

Não foi possível a obtenção de uma faixa de fusão, pois ocorreu decomposição, evidenciada pela alteração de cor da substância. A mudança de cor teve início em 180-185 °C, aumentando progressivamente de intensidade até completa decomposição (alaranjado-marrom-preto). Na faixa de 220-240 °C houve a formação de bolhas, cessando em aproximadamente 250 °C. Não foi encontrada faixa de fusão especificada para tigeciclina na literatura consultada (O'NEIL, 2006).

5.4 ANÁLISE TÉRMICA

Análise térmica é um dos mais importantes grupos de técnicas para caracterização física e química de materiais farmacêuticos. A longa história de utilização e a grande variedade de aplicações de métodos térmicos refletem a necessidade de ferramentas versáteis de caracterização no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Embora existam exemplos em que métodos térmicos forneceram informações químicas como pureza e/ou degradação, a vasta maioria de aplicações é associada à caracterização das propriedades e estrutura físicas de materiais. Em relação à estrutura física, são avaliados o arranjo das moléculas de composição conhecida e os eventos associados com mudanças neste arranjo físico. São estudados processos de fusão, cristalização e transição vítrea, os quais refletem a estrutura do material em condições ambiente ou de uso, tendo como exemplo a detecção de polimorfismo no estudo de variações no ponto de fusão. Alternativamente, o processo térmico pode prever a estabilidade física, como no estudo do comportamento da transição vítrea para prever as condições de armazenamento nas quais o risco de cristalização é minimizado (CRAIG e READING, 2007).

Os termos termogravimetria (TG), termogravimetria diferencial (DTG) e análises termogravimétricas (TGA) descrevem qualquer método experimental onde mudanças na massa são utilizadas para detectar e medir processos químicos e, menos frequentemente, físicos que ocorrem no aquecimento do produto sob investigação. O uso farmacêutico básico de TGA é na determinação do conteúdo de água. TGA é um método simples e rápido para determinação de perda de massa que é usualmente mais adequado do que, por exemplo, análises por Karl Fischer (CRAIG e READING, 2007).

Na análise térmica diferencial (DTA) mede-se a diferença de temperatura entre a substância analisada e o material de referência, quando ambos são submetidos a controle de temperatura programado (HATAKEYAMA e QUINN, 1994; CLASS et al., 1999). Na calorimetria exploratória diferencial (DSC) mede-se, ao invés da diferença de temperatura, a diferença de energia que é fornecida à substância em análise em comparação a um padrão inerte. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) é o método mais amplamente usado de análise térmica no âmbito farmacêutico. Esta técnica normalmente envolve a aplicação de aquecimento linear ou sinal de resfriamento para uma amostra e a subsequente medida da temperatura e energia associada com os eventos térmicos fusão, cristalização, transição vítrea e reações de decomposição. Existem muitas vantagens associadas ao método como a necessidade de pequena quantidade de amostra,

ampla faixa de temperatura disponível na maioria dos equipamentos comerciais e a simplicidade e velocidade da medida (CRAIG e READING, 2007).

O objetivo deste estudo foi determinar a estabilidade de tigeciclina frente à temperatura bem como sua pureza e faixa de fusão, através da análise das curvas obtidas e também pela comparação dos perfis de tigeciclina SQR e pó liofilizado.

5.4.1 Método

Foram utilizadas massas de $4,00 \pm 0,4$ mg de tigeciclina SQR e pó liofilizado, descritos nos itens 4.2 e 4.3. Analisou-se, também, em paralelo, lactose monoidratada, o único adjuvante presente no produto farmacêutico da tigeciclina.

As curvas de termogravimetria (TG) foram obtidas em módulo DTA-TGA simultâneo. O equipamento utilizado foi o modelo SDT-2960 TA Instruments (New Castle, Estados Unidos), com faixa de temperatura avaliada entre 25 e 1000 °C, sob atmosfera de nitrogênio (vazão 100 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min. As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina.

Na análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC), as curvas de DSC foram obtidas em equipamento modelo DSC-2910 TA Instruments (New Castle, Estados Unidos), com faixa de temperatura de 25 a 250 °C, sob atmosfera de nitrogênio (vazão 25 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min. Utilizaram-se cadinho de alumínio como suporte da amostra e, como referência, outro cadinho vazio.

5.4.2 Resultados

As Figuras 5.4.1, 5.4.2 e 5.4.3 demonstram o comportamento da tigeciclina nas análises por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial.

Figura 5.4.1 Curvas termogravimétricas obtidas na análise de tigeciclina SQR e pó liofilizado e lactose monoidratada

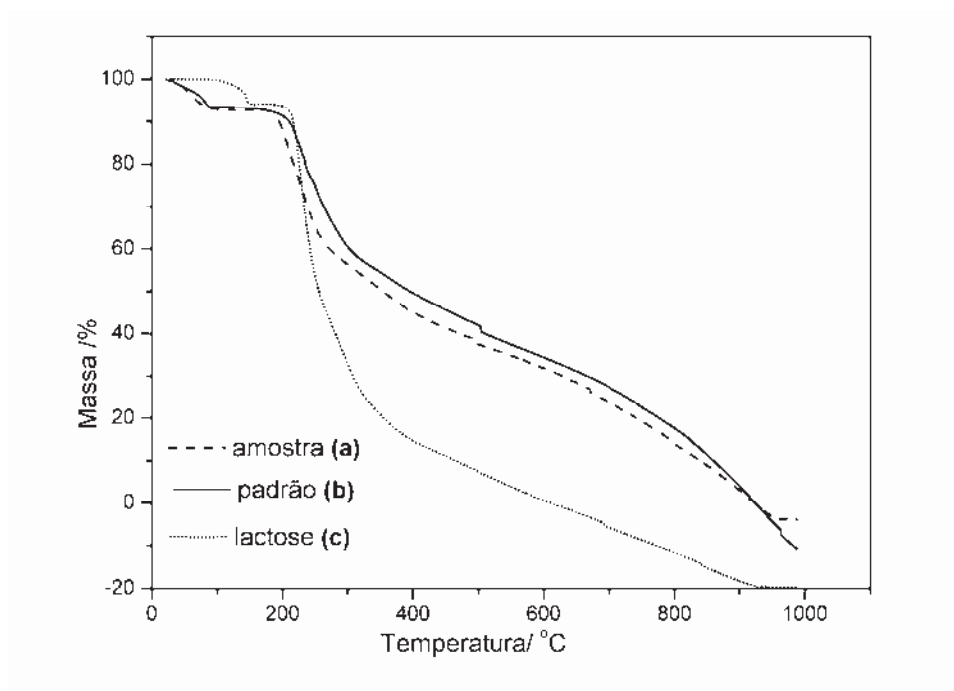
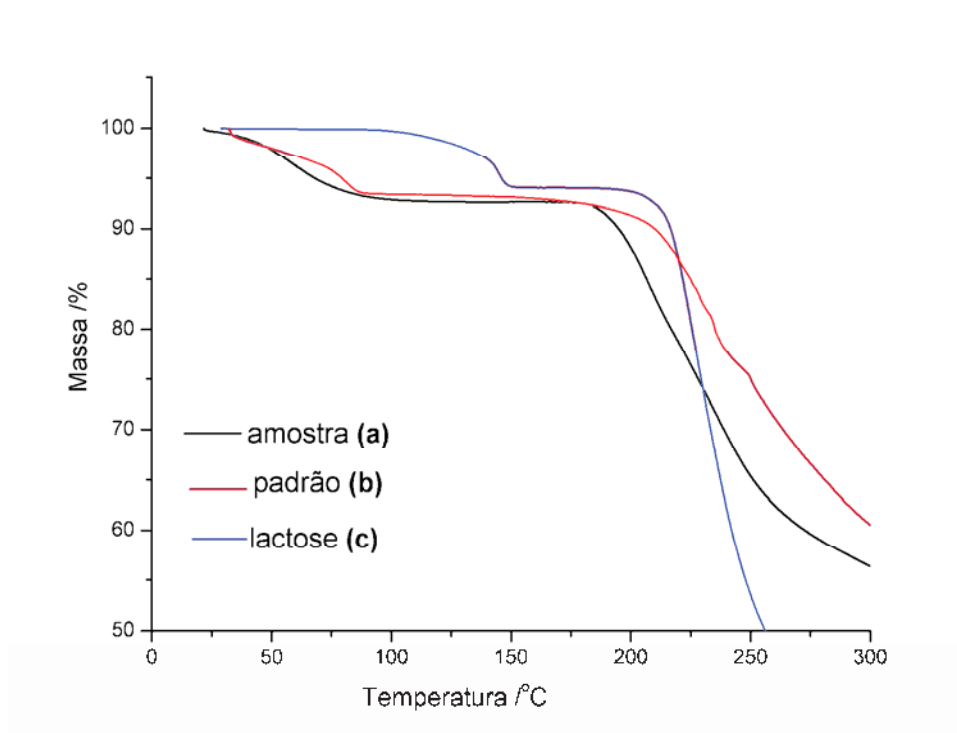
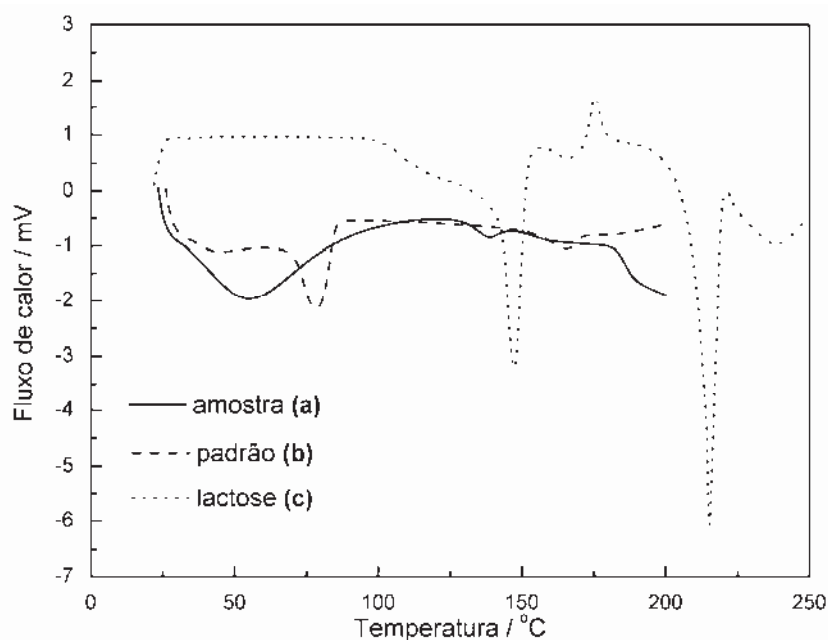


Figura 5.4.2 Alteração da escala da Figura 5.4.1 para melhor visualização dos eventos ocorridos na faixa de 0-300 °C



As curvas TG demonstraram que o padrão apresenta maior estabilidade térmica que a amostra, uma vez que o padrão inicia sua decomposição em 177,7 °C e a amostra em 168,9 °C. A curva TG da amostra revela que a perda de água ocorre no intervalo de 30 a 112 °C, enquanto que na curva do padrão ocorre no intervalo de 46 a 98 °C. A lactose apresenta a perda de água no intervalo de 89 a 161 °C e sua decomposição em 187,4 °C.

Figura 5.4.3 Curvas de DSC obtidas na análise de tigeciclina SQR e pó liofilizado e lactose monoidratada



A curva DSC da amostra mostra perda de água e em seguida sua decomposição térmica indicando o seu estado amorfo (não foi verificado pico endotérmico de fusão). A curva DSC do padrão mostra o seu estado mais cristalino, quando comparada com a curva da amostra, ocorrendo também perda de água e em seguida sua fusão em 78,3 °C e depois a sua decomposição.

A curva DSC da lactose mostra perda de água e em seguida um pico endotérmico em 147,2 °C referente a fusão, seguido de ocorrência de cristalização verificada pelo aparecimento de pico exotérmico em 175,6 °C e logo após a fusão verificada pelo pico endotérmico em 215,1 °C e

entalpia de 71,1 J/g. Após este pico, observa-se um pico endotérmico menor em 236,4 °C referente à decomposição térmica do composto fundido.

5.4.3 Discussão

Recentemente, o estudo de estrutura cristalina de fármacos tem recebido especial atenção, devido a múltiplas razões. Primeiro, tem se observado que o conhecimento do estado amorfo de fármacos é necessário para otimização do processo de produção de muitos produtos farmacêuticos que utilizam sistemas de secagem, assim como materiais poliméricos como microesferas de ácido polilático e filmes de revestimento. Segundo, fármacos amorfos podem apresentar características de dissolução aumentadas, com concomitante possibilidade de aumento de biodisponibilidade. Terceiro, é possível gerar material amorfo a partir de substâncias cristalinas por moagem ou secagem. Esta fração amorfa pode alterar as propriedades do processo e a estabilidade do material (CRAIG e READING, 2007).

Através das análises das curvas termogravimétricas foi possível verificar as perdas de massa de tigeciclina SQR e pó liofilizado e lactose monoidratada, sendo os perfis de SQR e produto farmacêutico similares, com diferenças nas temperaturas de perda de água o que pode ser atribuído aos diferentes processos de fabricação e à presença de adjuvante.

Na análise por DSC, as curvas de tigeciclina SQR e pó liofilizado foram diferentes, caracterizando diferentes formas cristalinas das duas amostras. O estado amorfo da amostra de produto farmacêutico pode ser atribuído ao processo de fabricação, conforme destacado acima. Observou-se pico endotérmico em temperatura de 78,3 °C sendo atribuído a fusão do fármaco.

A fusão de tigeciclina SQR a 78,3 °C não foi observada quando avaliada em equipamento de determinação da faixa de fusão em capilar, pois este é um método menos sensível, não possibilitando a visualização da mudança de estado físico deste fármaco, ocorrendo decomposição logo após a sua fusão.

5.5 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DE INFRAVERMELHO

A espectrofotometria no infravermelho situa-se entre as regiões do visível e das micro-ondas. Neste espectro, a correlação pico a pico é uma ótima evidência para a identidade da amostra. O espectro de infravermelho é característico da molécula como um todo, mas certos grupos de átomos originam picos de absorção que ocorrem em frequência próxima independente da estrutura da molécula (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

5.5.1 Método

Os espectros foram obtidos com auxílio de espectrofotômetro FTIR SHIMADZU (Tóquio, Japão), modelo 3000 (Columbia, USA), adicionando aproximadamente 4 mg de tigeciclina SQR, tigeciclina pó liofilizado e excipiente lactose monoidratada, em pastilhas de 250 mg de brometo de potássio dessecado.

5.5.2 Resultados

Os espectros na região do infravermelho obtidos estão representados pelas Figuras 5.5.1, 5.5.2 , 5.5.3 e 5.5.4.

Figura 5.5.1. Espectro na região de infravermelho de tigeciclina SQR em pastilhas de KBr

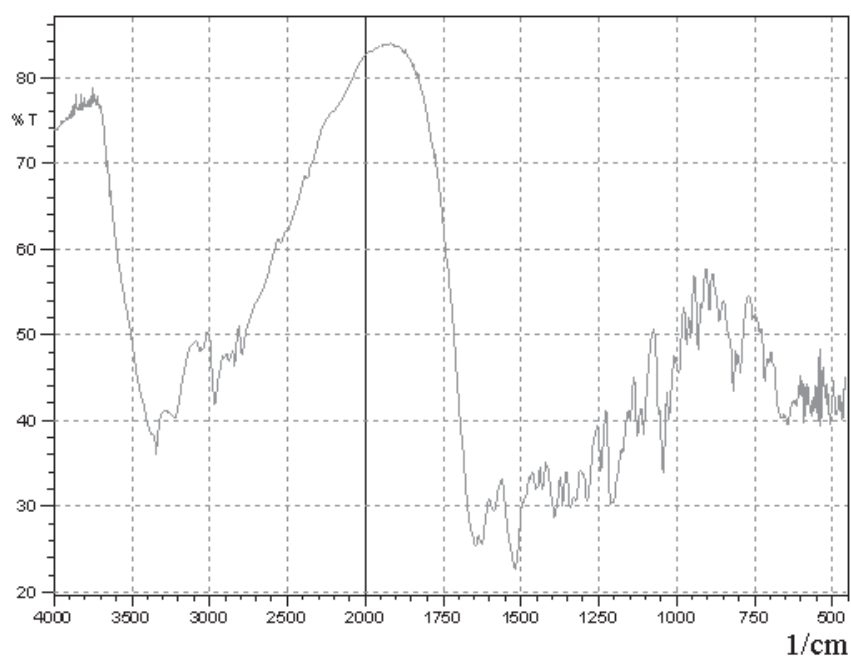


Figura 5.5.2. Espectro na região de infravermelho de tigeciclina pó liofilizado em pastilhas de KBr

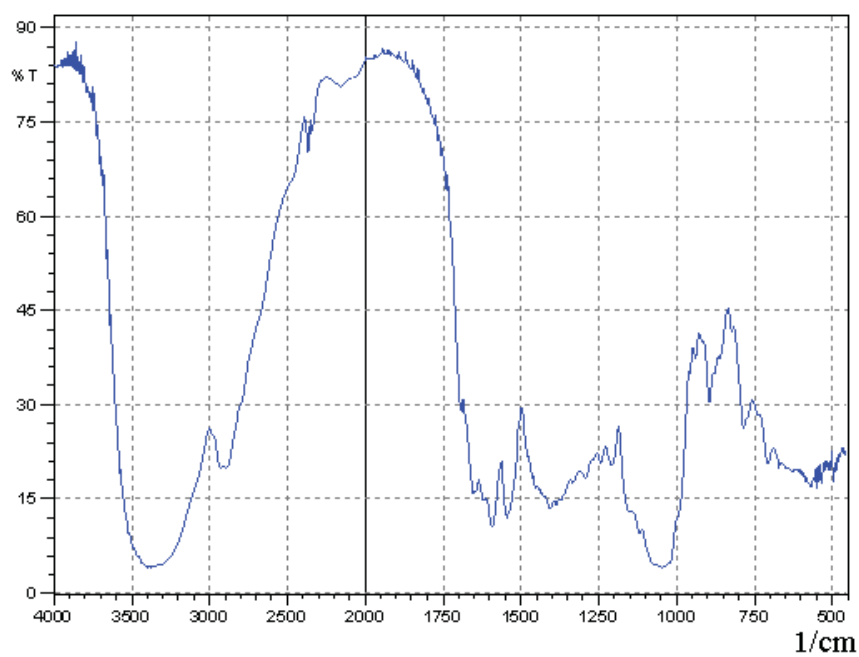


Figura 5.5.3. Espectro na região de infravermelho de lactose monoidratada em pastilhas de KBr

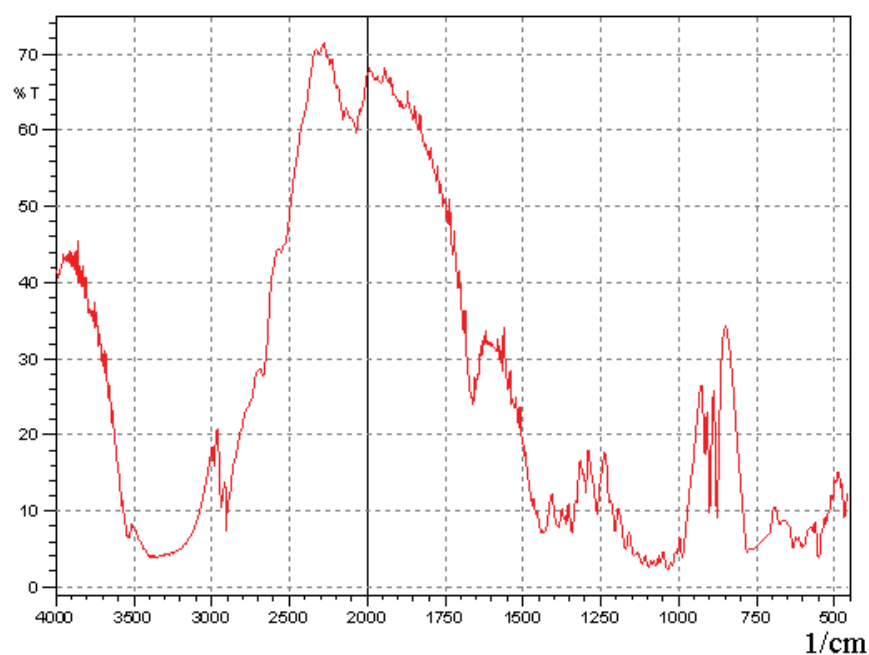
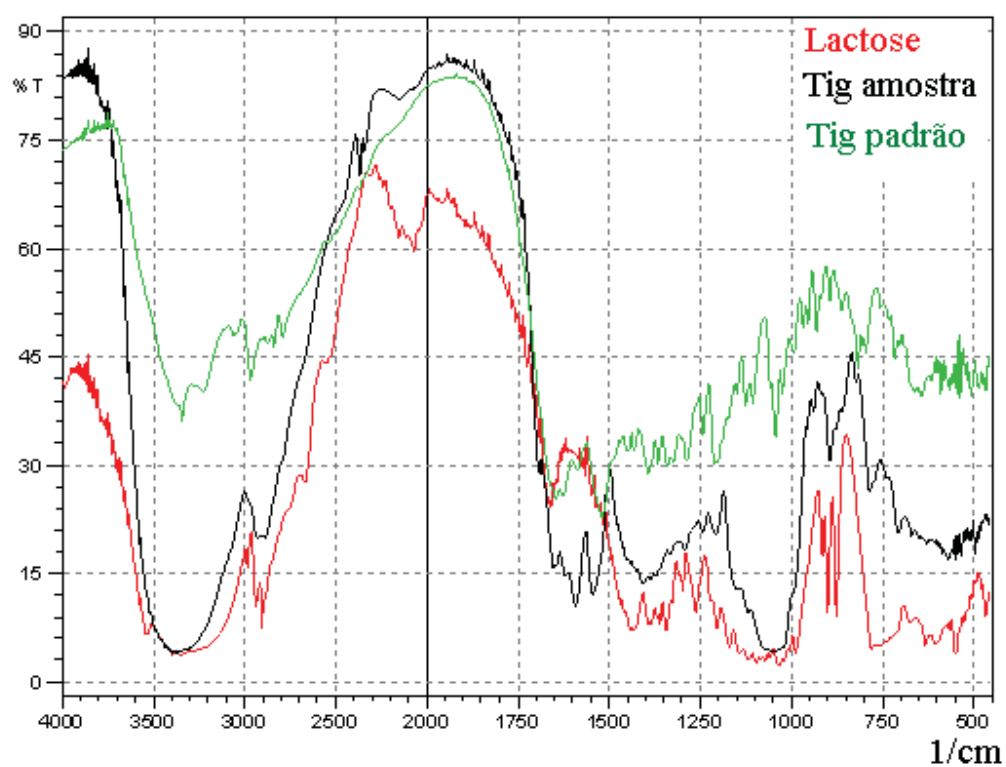


Figura 5.5.4. Espectros na região de infravermelho de tigeciclina SQR, tigeciclina pó liofilizado e lactose monoidratada sobrepostos



5.5.3 Discussão

O espectro de absorção na região infravermelho em pastilhas de KBr apresentou bandas de absorção características dos grupamentos químicos presentes na molécula de tigeciclina, conforme apresentado na Tabela 5.5.1.

Tabela 5.5.1. Faixas de frequências e grupamentos correspondentes das bandas observadas nos espectros de infravermelho de tigeciclina SQR e pó liofilizado

Faixa de frequências (cm ⁻¹)	Grupamentos responsáveis
3550 – 3200	Deformação axial dos grupamentos O-H de álcoois e fenóis
1685 – 1666	Deformação axial do grupamento C=O de cetona conjugadas
1680 -1640	Deformação axial do grupamento C=O de amidas primárias e secundárias
1650 – 1515	Deformação angular do grupamento N-H de amidas primárias e secundárias
1600 – 1585 e 1500 - 1400	Deformação axial do grupamento C-H de anel aromático
1260 – 1000	Deformação axial do grupamento C-O de álcoois e fenóis
1250 – 1020	Deformação axial do grupamento C-N de aminas secundárias e terciárias

A interpretação dos espectros de absorção no infravermelho de tigeciclina é dificultada pela complexidade da molécula, a qual apresenta muitos grupamentos que exercem influência sobre regiões vizinhas, modificando as frequências de absorção. Além disso, alguns grupamentos apresentam absorção em regiões similares, havendo sobreposição de bandas, como no caso da deformação axial do grupamento O-H (3550-3200 cm⁻¹) que apresenta uma banda larga que impede a visualização das bandas de deformação axial do grupamento N-H de aminas primárias e secundárias (3500, 3400 e 3350-3310 cm⁻¹). Assim, técnicas complementares são necessárias para que se obtenha uma completa identificação desta molécula.

O adjuvante lactose monoidratada, quando analisado isoladamente, apresentou alta absorvidade no infravermelho, com bandas altas em regiões de absorção comuns aos grupamentos presentes na molécula da tigeciclina. Justificou-se assim, as diferenças observadas entre os espectros da SQR e da amostra de pó liofilizado, o que não impediu a observação de bandas similares, características dos grupamentos presentes em ambos. Os espectros obtidos foram analisados de acordo com dados apresentados na literatura (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

5.6 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

Fármacos podem ser identificados através da análise de seu espectro de absorção na região do ultravioleta (200-400 nm). Com a utilização de diferentes solventes (água, metanol, ácido clorídrico 0,1 *M* e hidróxido de sódio 0,1 *M*), pode-se observar as bandas de absorção máxima de tigeciclina, assim como a influência do pH em suas características de absorção.

5.6.1 Material

Todas as determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu (Tóquio, Japão), modelo UV mini-1240, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Utilizaram-se como solventes água purificada (Milli-Q®), ácido clorídrico PA (Synth), hidróxido de sódio PA (Merck) e metanol PA (Synth). A substância química de referência utilizada foi descrita no item 4.2.

5.6.2 Método

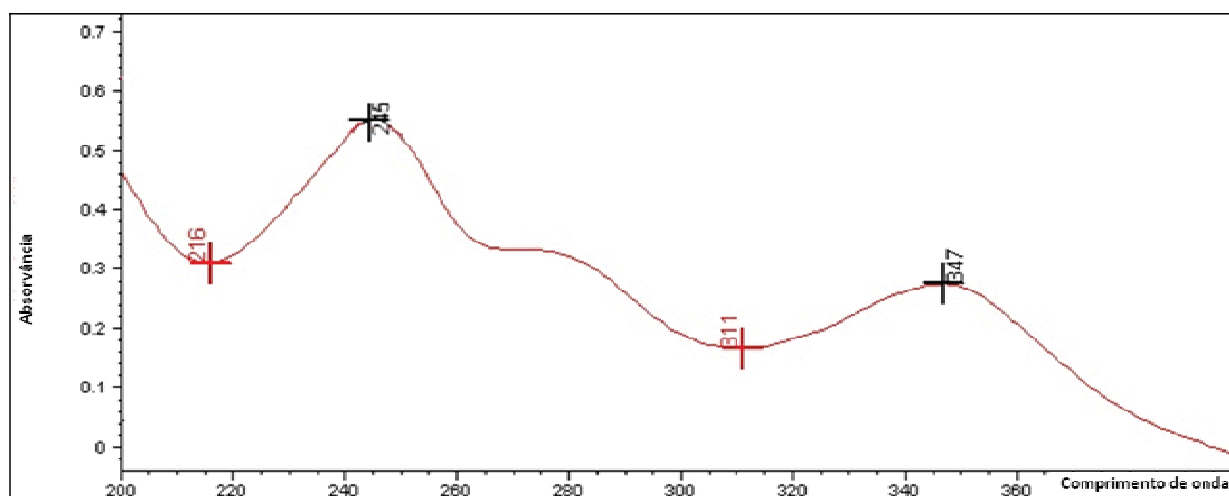
Quatro pesagens de 2,5 mg de tigeciclina SQR foram transferidas para quatro balões volumétricos de 50 mL, completou-se o volume com água, metanol, ácido clorídrico 0,1 *M* e hidróxido de sódio 0,1 *M*, respectivamente, obtendo-se soluções de 50 µg/mL. Destas soluções, retiraram-se 3,2 mL, que foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se soluções de 16 µg/mL, após completar o volume com os diferentes solventes. Os espectros de absorção da SQR foram registrados na faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.

5.6.3 Resultados

5.6.3.1 Espectro em água

Observou-se um máximo de absorção no comprimento de onda em 245 nm, com absorvância de 0,5541, para tigeciclina dissolvida em água a 16,0 µg/mL (Figura 5.6.1).

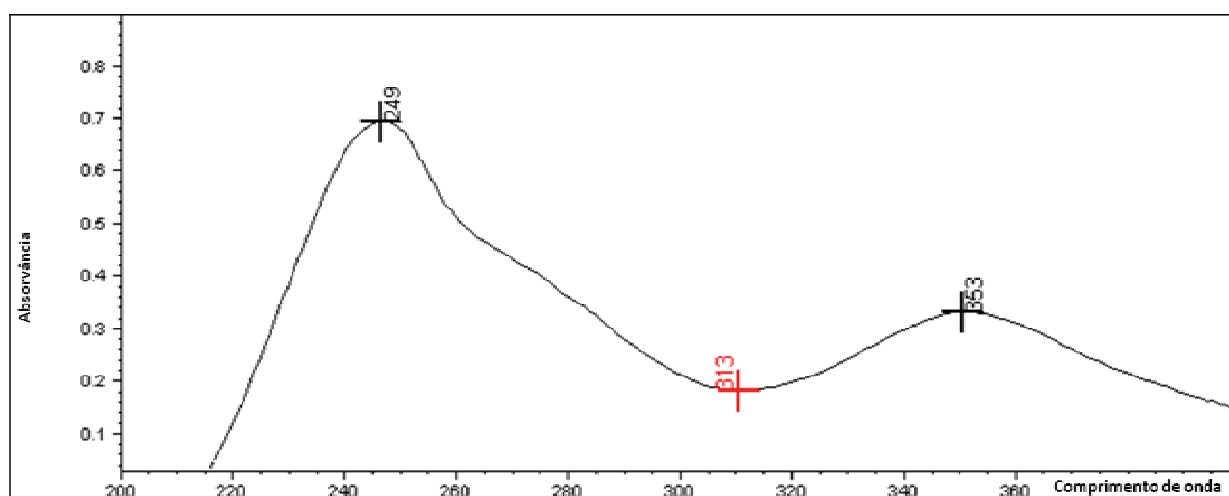
Figura 5.6.1. Espectro de absorção da solução de tigeciclina SQR com concentração de 16,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando água como solvente



5.6.3.2 Espectro em metanol

A banda de máxima absorção de tigeciclina, utilizando metanol como solvente a 16,0 µg/mL, encontra-se em 249 nm, com absorvância de 0,6906 (Figura 5.6.2).

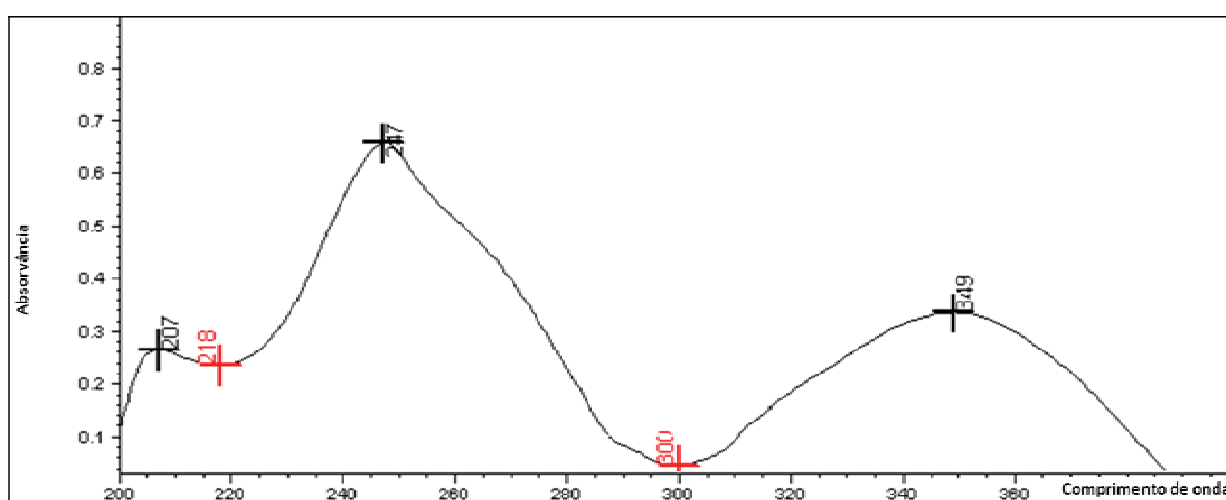
Figura 5.6.2. Espectro de absorção da solução de tigeciclina SQR com concentração de 16,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando metanol como solvente



5.6.3.3 Espectro em ácido clorídrico 0,1 M

O comprimento de onda máximo observado para tigeciclina em meio ácido a 16,0 µg/mL foi de 247 nm e absorvância de 0,6727 (Figura 5.6.3).

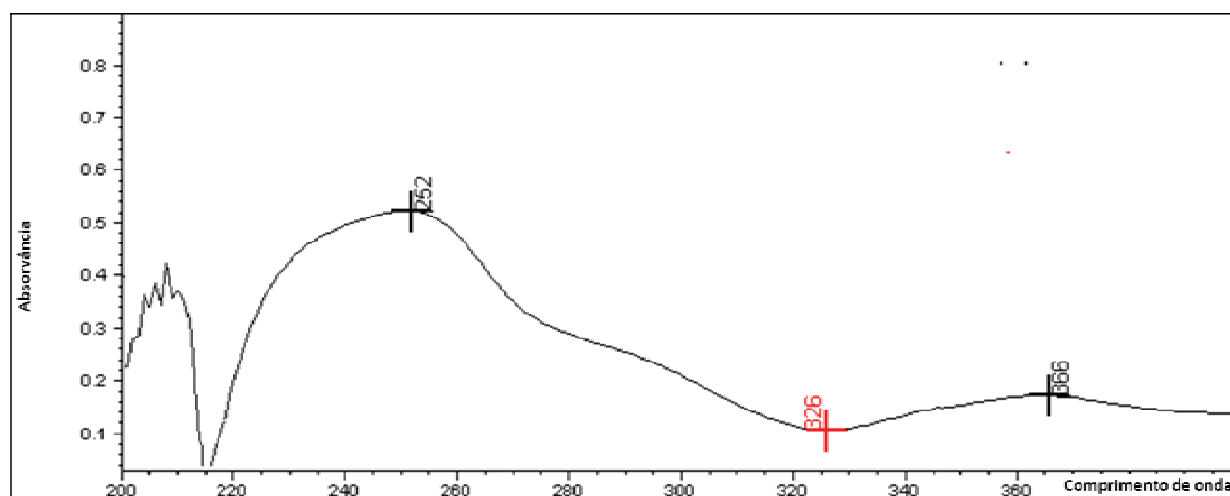
Figura 5.6.3. Espectro de absorção da solução de tigeciclina SQR com concentração de 16,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente



5.6.3.4 Espectro em hidróxido de sódio 0,1 M

Na Figura 5.6.4, observa-se o espectro de absorção da solução de tigeciclina a 16,0 µg/mL quando diluído em solução de hidróxido de sódio de 0,1 M com absorção máxima em 252 nm e absorvância de 0,5360.

Figura 5.6.4. Espectro de absorção de solução de tigeciclina SQR com concentração de 16,0 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando hidróxido de sódio 0,1 M como solvente



5.6.4 Discussão

A absorção molecular na região do ultravioleta do espectro depende da estrutura eletrônica da molécula, assim, a identificação do fármaco pode ser feita pela determinação de suas características de absorção em diferentes solventes (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

A tigeciclina mostrou-se solúvel em água, metanol, HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M. Em NaOH 0,1 M, o fármaco apresentou um espectro de absorção sugestivo de degradação alcalina (Figura 5.6.4), pois observa-se uma menor absorção e desaparecimento do máximo de absorção na região de 350 nm. Os máximos de absorção em HCl 0,1 M (247 nm), NaOH 0,1 M (250 nm) e metanol (249 nm) apresentaram deslocamento batocrômico em relação à absorção em água (245 nm). Isto ocorre, provavelmente, devido à influência de grupos auxocrômicos dos solventes sobre o cromóforo. Os solventes HCl 0,1 M e metanol também provocaram efeito hiperacrômico, apresentando absorvância maior em relação ao solvente água. Neste trabalho, optou-se pela utilização da água como solvente por possuir vantagens econômicas e ambientais, tais como ser de fácil aquisição e/ou descarte e baixo custo, tendo em vista as características adequadas apresentadas no espectro.

5.7 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO VISÍVEL

Fármacos podem ser identificados através da análise do espectro de absorção na região do visível do produto colorido da reação entre o fármaco e um reagente apropriado. Com a utilização do reagente acetato de cobre e tampão acetato pH 3,0, obteve-se o produto da reação com banda de absorção máxima na região do visível. Compararam-se os espectros da tigeciclina na presença e ausência de acetato de cobre, ambos em pH 3,0 para confirmação da reação.

5.7.1 Material

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu (Tóquio, Japão), modelo UV mini-1240, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Para comparação dos espectros utilizou-se espectrofotômetro UV/Vis Hewlett-Packard modelo 8453. O ajuste de pH do tampão foi realizado em peagômetro digital Micronal, modelo B474. Utilizou-se água purificada (Milli-Q®), acetato de cobre (Merck) e acetato de sódio (Synth). A substância química de referência utilizada foi descrita no item 4.2.

5.7.1.1 Preparo da solução de cloridrato de tigeciclina SQR

Pesou-se quantidade equivalente a 2,0 mg de tigeciclina SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL com auxílio de água, completando-se o volume com mesmo solvente, obtendo-se a concentração de 200,0 µg/mL.

5.7.1.2 Preparo do reagente acetato de cobre 5%

Pesou-se 5,0 g de acetato de cobre e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água. Levou-se ao ultrassom por 30 minutos para solubilização e completou-se com água, obtendo-se reagente com concentração final de 5,0%.

5.7.1.3 Preparo do tampão pH 3,0

Pesou-se 4,0 g de acetato de sódio anidro e dissolveu-se em 800 mL de água, após quantidade suficiente de ácido acético glacial (aproximadamente 130 mL) foi adicionado para ajuste de pH. A solução foi transferida para balão volumétrico de 1000 mL, completando-se o volume com água.

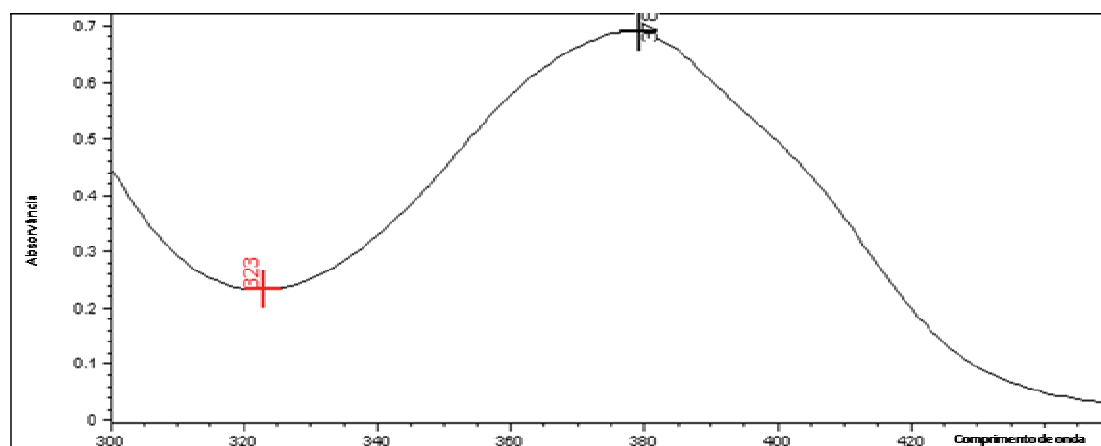
5.7.2 Método

Em balão volumétrico de 10 mL adicionaram-se 1 mL de tampão, 1,1 mL de solução de tigeciclina e 1 mL de solução de acetato de cobre, após completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 22 µg/mL de tigeciclina. As leituras foram efetuadas imediatamente, em espectrofotômetro contra o branco preparado da mesma forma, exceto pela adição do fármaco. Os espectros de absorção da SQR foram registrados numa faixa de comprimento de onda entre 350 e 800 nm e, após, 350-500 nm para melhor visualização do comprimento de onda de máxima de absorção.

5.7.3 Resultados

Após reação com acetato de cobre 5,0%, observou-se um máximo de absorção no comprimento de onda de 378 nm, com absorvância de 0,5375, para tigeciclina dissolvida em água a 22,0 µg/mL, conforme apresentado na Figura 5.7.1.

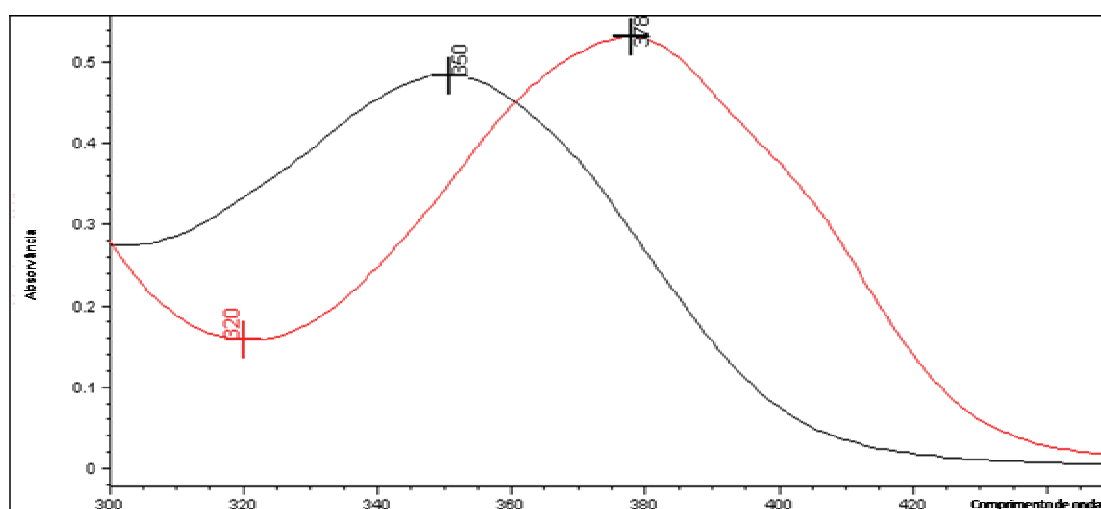
Figura 5.7.1. Espectro de absorção na região do visível da solução de tigeciclina SQR na concentração de 22 $\mu\text{g/mL}$, após reagir com acetato de cobre, em pH 3,0, utilizando água como solvente



A

A Figura 5.7.2 apresenta os máximos de absorção das soluções preparada com (λ máximo: 378 nm) e sem (λ máximo: 350 nm) adição da solução de acetato de cobre, ambas em pH 3,0 e concentração de tigeciclina 22,0 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 5.7.2. Comparação dos espectros de absorção na região do visível de tigeciclina SQR, em pH 3,0, na concentração de 22 $\mu\text{g/mL}$, na ausência (λ máximo: 350 nm) e presença de acetato de cobre (λ máximo: 378 nm), utilizando água como solvente



5.7.4 Discussão

Uma vez que a tigeciclina provoca alteração da cor azul do acetato de cobre para esverdeado, absorvendo na região do visível, é possível a utilização deste reagente para a análise qualitativa desta glicilciclina, já que o produto formado absorve em comprimento de onda específico. O mecanismo sugerido para a reação entre tigeciclina e acetato de cobre está descrito no item 6.5.8 deste trabalho.

5.8 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido-sólido, na qual a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. Por ser um método simples, rápido, visual e econômico, a CCD é a técnica predominantemente escolhida para o acompanhamento de reações orgânicas e indicada quando o volume e frequência de análises não justificam o emprego de métodos instrumentais mais complexos, como a cromatografia líquida de alta eficiência.

5.8.1 Material

As placas utilizadas para identificação do fármaco foram cromatofolhas de sílica-gel 60 F254 (20 x 20 cm) (Merck), com espessura de 0,25 mm, adquiridas comercialmente. Utilizou-se metanol (Synth) como solvente, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Química Moderna) e hidróxido de sódio (Synth), para preparo da solução de saturação das placas. A fase móvel foi constituída de diclorometano (Synth), metanol (Synth) e água purificada. A substância química de referência e as amostras de pó liofilizado utilizadas foram descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente.

5.8.2 Método

Antes da análise, as placas foram borrifadas com solução de EDTA 10%, ajustada para pH 9,0 com solução de NaOH 10 M, deixadas a temperatura ambiente por 30 minutos para secagem e, após, ativadas em estufa a 70 °C por uma hora.

Foram pesados 7,5 mg de tigeciclina SQR e o equivalente de pó liofilizado e transferidos para balão volumétrico de 5 mL, completou-se o volume com metanol, obtendo-se solução com concentração de 1,5 mg/mL.

O equivalente a 8,35 mg de tigeciclina pó liofilizado foi pesado e transferido para balão volumétrico de 5 mL, completou-se o volume com metanol, obtendo-se solução com concentração de 1,67 mg/mL. Após, 900 µL desta solução e 100 µL de soluções de NaOH 1 M, HCl 1 M ou peróxido de hidrogênio 30% foram misturados para degradações básica, ácida e oxidativa, respectivamente. Para degradações neutra e fotolítica (luz UVC 254 nm), as amostras foram diluídas para 1,5 mg/mL com metanol. As degradações ácida, básica e neutra foram realizadas em banho a 70 °C por 3 horas. A degradação oxidativa foi realizada por 15 minutos e a degradação fotolítica por 3 horas (Figura 5.8.3 e 5.8.4 A) e 24 horas (Figura. 5.8.4. B). Os brancos das soluções de degradação foram preparados da mesma forma que as amostras, porém sem adição de fármaco, sendo o volume de solução de fármaco substituído por solvente.

Foram testados os seguintes sistemas de fases móveis com soluções de tigeciclina SQR e pó liofilizado:

Sistema 1: metanol : acetonitrila : ácido oxálico (10:10:30) v/v/v

Sistema 2: metanol : acetonitrila : ácido oxálico (5:5:40) v/v/v

Sistema 3: metanol : diclorometano : água (36:58:6) v/v/v

Sistema 4: clorofórmio : metanol : EDTA 5% (65:20:5) v/v/v

Sistema 5: metanol : acetonitrila : isopropanol : água (5:4:0,5:0,5) v/v/v/v

Sistema 6: etanol: ácido acético: água (20:12:12) v/v/v

Sistema 7: metanol : diclorometano : água (35:57:8) v/v/v

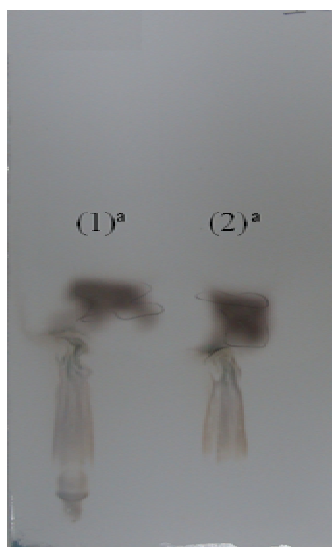
Para o ensaio, após a ativação da placa, procedeu-se a saturação da cuba com o sistema de fase móvel. Com auxílio de seringa de 25 µL, foram transferidas as soluções de tigeciclina SQR e pó liofilizado e amostras degradadas para as placas, procedendo-se a cromatografia. Após migração da fase móvel, a placa foi retirada da cuba de vidro, deixando o solvente evaporar. A

revelação das placas foi realizada em vapor de iodo, entretanto, fluorescência em câmara UV (luz UVA 365 nm) também foi observada. Realizou-se a comparação das manchas quanto à forma, posição e tamanho e os valores de R_f de tigeciclina SQR e pó liofilizado foram calculados.

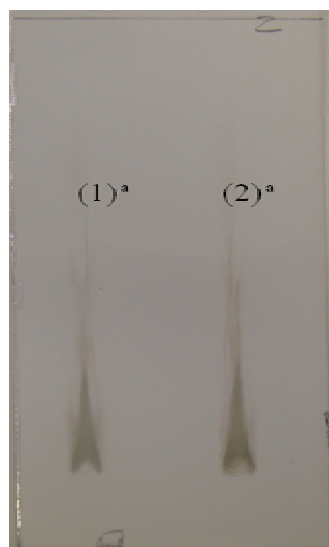
5.8.3 Resultados

A Figura 5.8.1 mostra as fotografias dos cromatogramas de tigeciclina SQR e pó liofilizado nos solventes dos sistemas 1, 2 e 3.

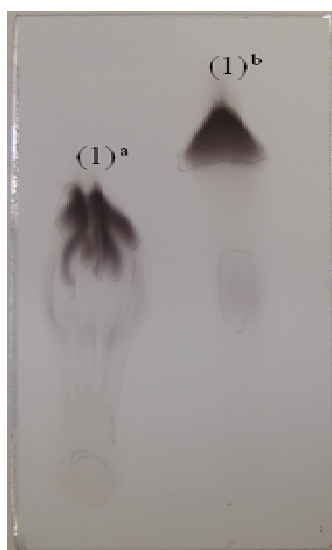
Figura 5.8.1. Cromatogramas obtidos de tigeciclina SQR (1) e tigeciclina pó liofilizado (2) na concentração de 1,5 mg/mL. As soluções de tigeciclina foram preparadas em água ()^a, metanol ()^b e em água seguida de metanol ()^c



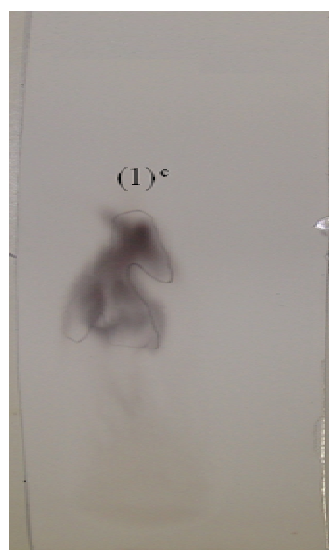
Sistema 1



Sistema 2



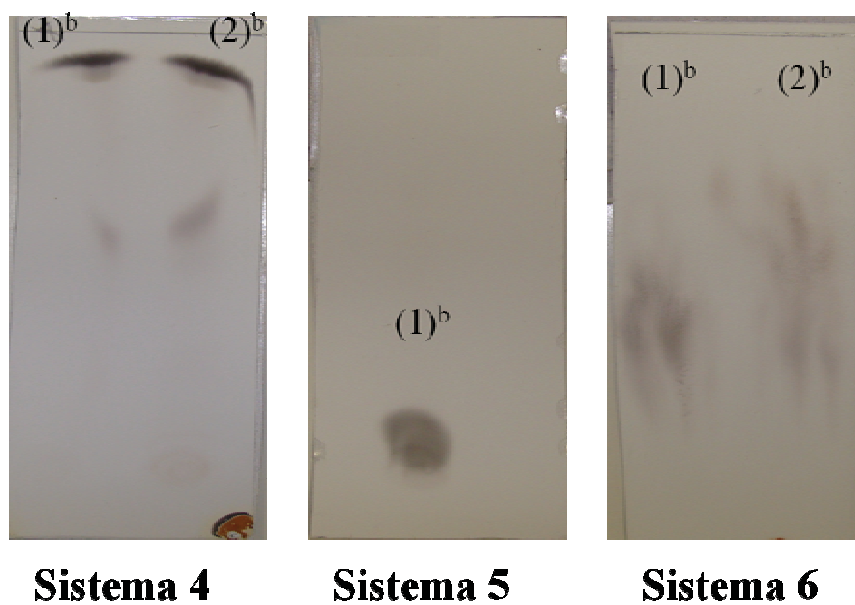
Sistema 3



Sistema 3

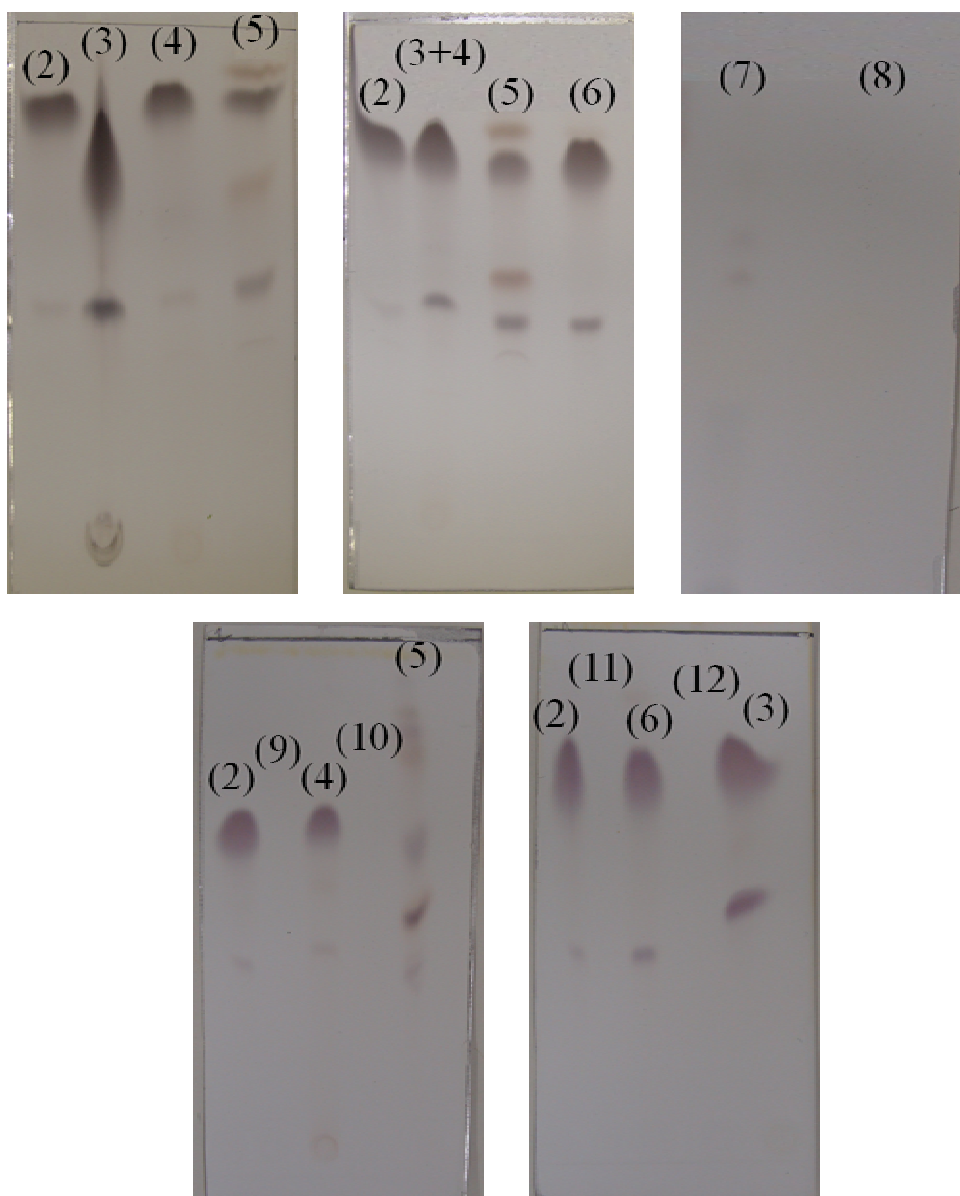
A Figura 5.8.2 mostra as fotografias dos cromatogramas de tigeciclina SQR e pó liofilizado nos solventes dos sistemas 4, 5 e 6.

Figura 5.8.2. Cromatogramas obtidos de tigeciclina SQR (1) e tigeciclina pó liofilizado (2), ambos diluídos para concentração de 1,5 mg/mL em metanol (^b)



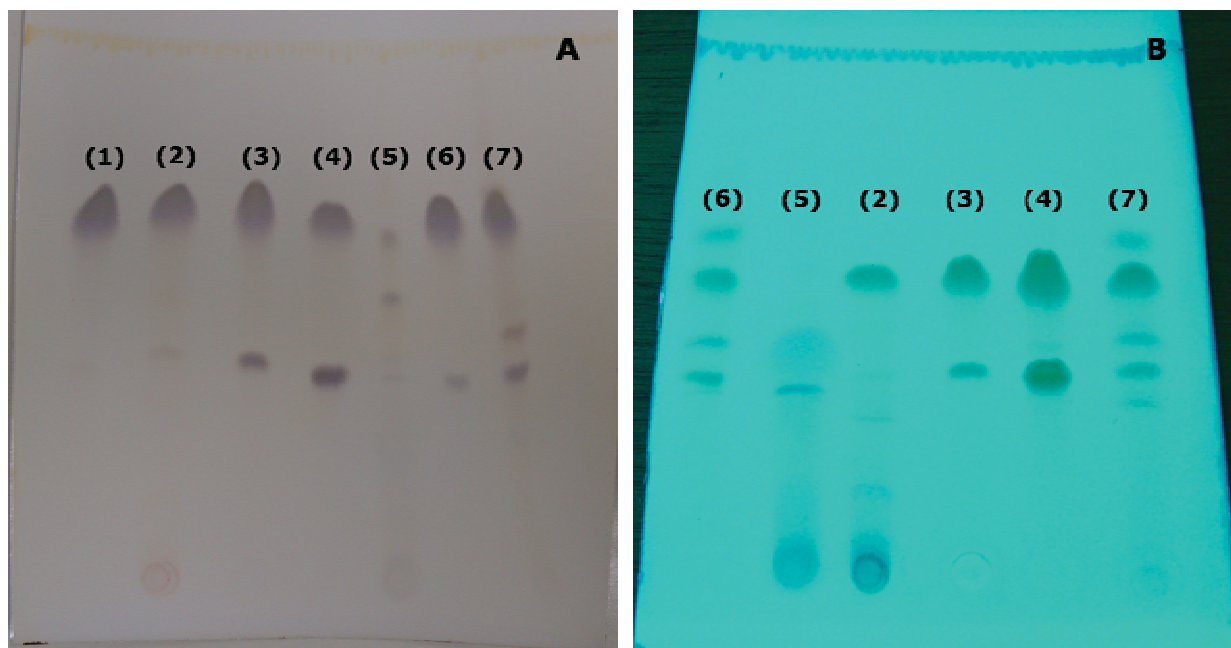
A Figura 5.8.3 mostra as fotografias dos cromatogramas de tigeciclina pó liofilizado intacto e degradado nos solventes do sistema 7.

Figura 5.8.3. Cromatogramas obtidos de tigeciclina pó liofilizado, diluído em metanol (1,5 mg/mL), intacto (2) e após degradação: ácida (3), básica (4), mistura da ácida + básica (3+4), neutra (5), fotolítica (6) e oxidativa (7). Sendo (8) o branco da degradação oxidativa, (9) da básica, (10) da neutra, (11) da fotolítica e (12) da ácida



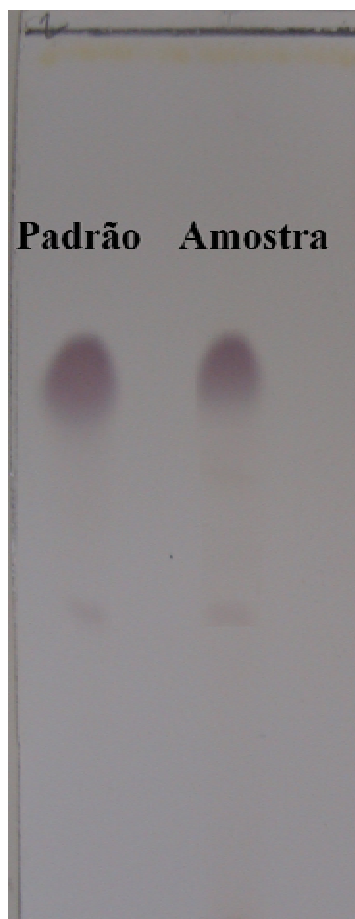
A Figura 5.8.4 mostra as fotografias dos cromatogramas de tigeciclina pó liofilizado intacto e degradado nos solventes do sistema 7, revelados em vapor de iodo e luz ultravioleta.

Figura 5.8.4. Cromatogramas de tigeciclina pó liofilizado, diluído em metanol (1,5 mg/mL), intacto (1) e após degradação: básica (2), ácida (3), neutra (4), oxidativa (5) e fotolítica (6). Sendo (7) a mistura dos degradados. A revelação foi realizada em vapor de iodo (A) e em câmara UV (luz UVA 365 nm) (B)



A Figura 5.8.5 mostra a fotografia dos cromatogramas de tigeciclina SQR e pó liofilizado nos solventes do sistema 7. Os Rfs calculados para padrão e amostra foram 0,60 e 0,61, respectivamente.

Figura 5.8.5. Cromatograma obtido de tigeciclina SQR e pó liofilizado, revelado em vapor de iodo



5.8.4 Discussão

A cromatografia em camada delgada foi empregada com o objetivo de identificar a tigeciclina em pó liofilizado e também distinguir tigeciclina de seus produtos de degradação, utilizando para isso vários sistemas solventes. A tigeciclina indica, no vapor de iodo e no UV-longo, uma mancha bem característica, de intensidade de cor roxa, facilmente identificável.

Através da análise da estrutura química da tigeciclina, pode-se concluir que é uma molécula polar, com grupos funcionais orgânicos bem característicos. Nos sistemas 1 e 2, o perfil da placa não foi satisfatório, podendo ser atribuído à não saturação da placa com solução de EDTA, o que não foi realizado devido à presença de ácido oxálico na fase móvel, salientando que

ambos possuem a propriedade de evitar a formação de quelatos entre a tigeciclina e possíveis metais presentes na placa, melhorando assim a resolução dos pontos. No sistema 4, o fármaco migrou muito rapidamente, não havendo interação com a placa, por outro lado, no sistema 5, não houve migração do fármaco. No sistema 6, a amostra migrou, mas não de modo homogêneo, espalhando-se pela placa.

Na literatura foram encontrados trabalhos utilizando CCD com o objetivo de identificar tetraciclina. Para tigeciclina não são descritos métodos por CCD, adotando-se como referência os estudos com tetraciclina.

A CCD apresenta-se como uma importante ferramenta, com a qual é possível caracterizar a maioria das moléculas farmacêuticas. Além disso, é de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. O método por CCD desenvolvido demonstrou ser adequado para a identificação de tigeciclina na forma farmacêutica, e o melhor sistema desenvolvido e adequado para identificação de produtos de degradação foi o sistema 7 composto por metanol, diclorometano e água (35:57:8), v/v/v.

ANÁLISE QUANTITATIVA

6 ANÁLISE QUANTITATIVA

6.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Na indústria farmacêutica, a cromatografia líquida de alta eficiência é a ferramenta de análise mais utilizada, aplicada em todos os estágios de pesquisa, desenvolvimento e produção de fármacos (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007). A cromatografia líquida é um processo de separação em que os componentes de uma amostra são distribuídos entre duas fases imiscíveis, uma móvel e outra estacionária. A fase estacionária pode ser sólida, sendo porosa ou na forma de pequenas partículas. A fase móvel é composta por solventes de diferentes polaridades (MEYER, 2010). O sistema composto de fase estacionária mais apolar em relação à fase móvel é classificado como cromatografia líquida em fase reversa. Neste sistema, a separação das moléculas é baseada na sua hidrofobicidade. Moléculas hidrofílicas ficam menos retidas em uma coluna de fase reversa comparadas a moléculas hidrofóbicas, quanto mais tempo o soluto fica retido na fase estacionária, maior o fator de retenção. Como resultado, as moléculas com diferentes constantes de equilíbrio eluem com diferentes tempos e são separadas. É comum a análise de amostras hidrofóbicas com eluição em gradiente usando duas fases móveis diferentes. Neste sistema, a amostra, dissolvida em eluente polar, é injetada em uma coluna equilibrada com o mesmo eluente. A molécula hidrofóbica ficará retida na coluna devido à sua maior afinidade com a fase estacionária apolar. Após a injeção da amostra, um gradiente é iniciado com aumento contínuo da concentração do eluente apolar na fase móvel. A molécula eluirá quando a afinidade pela fase móvel for maior que pela fase estacionária (SCHLUTER, 1999).

A fase estacionária apolar da fase reversa é usualmente um grupo alquil ligado a um suporte de sílica, o qual é preparado através da ligação covalente do grupo alquil ao grupo silanol superficial da sílica (SCHLUTER, 1999). As propriedades da sílica têm sido estudadas por anos e a tecnologia de fabricação de partículas esféricas porosas de tamanho e porosidade controlados está bem desenvolvida (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

Sistemas em fase reversa são os mais comumente utilizados, sendo quase 90% das análises de amostras de baixo peso molecular. A elevada utilização deste modo de eluição se deve à habilidade de discriminar componentes muito semelhantes entre si e à facilidade de variação da retenção e seletividade (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007). Neste contexto, desenvolveu-se

um método por cromatografia líquida em fase reversa para quantificação de tigeciclina em pó liofilizado e separação de seus diferentes produtos de degradação, através do estudo dos parâmetros preparo da amostra, coluna, fase móvel e sistema de detecção.

6.1.1 Ensaios preliminares

Diferentes sistemas cromatográficos foram testados com objetivo de encontrar condições favoráveis à quantificação do fármaco e adequada separação de seus produtos de degradação.

6.1.2 Material

Foram utilizados tigeciclina SQR e pó liofilizado, descritos nos itens 4.2 e 4.3. Utilizaram-se como solventes: acetonitrila (JTBaker), metanol (JTBaker), ambos grau CLAE; água purificada (Milli-Q); ácido fosfórico (Synth) grau analítico. Os reagentes utilizados foram acetato de amônio, ácido oxálico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de potássio monobásico e ácido octanossulfônico. As soluções foram filtradas através de membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm (Sartorius) e degaseificadas em ultrassom (Unique) durante 30 minutos.

O sistema cromatográfico utilizado foi cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters, composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters® 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detector UV-Vis Waters® 2487. Foram utilizadas colunas Symmetry C18 Waters 5 µm (250 x 4,6 mm) e Luna C₁₈ Phenomenex 5 µm (250 x 4,6 mm). As áreas dos picos foram integradas automaticamente usando o programa de software Empower 2.

6.1.3 Preparo das fases móveis

Foram preparadas soluções aquosas de trietilamina, ácido acético, ácido fosfórico nas concentrações de 0,1% e 0,3% v/v (pH 3,0; pH 2,5), adicionados ou não de EDTA e trietilamina, ácido oxálico 0,02 M (pH 3,0). Os tampões utilizados foram acetato de amônio 50 mM (pH 6,2), fosfato de potássio monobásico 0,01 M e 0,05 M (pH 3,0; pH 4,0; pH 7,0) fosfato de sódio monobásico 0,023 M, 0,03 M e 0,06 M (pH 3,0; pH 2,5; pH 7,0), fosfato de sódio monobásico 0,015 M + ácido oxálico 0,015 M (pH 7,0). As fases móveis foram compostas de diferentes

proporções das soluções aquosas e solventes orgânicos e as misturas foram realizadas no equipamento. Cada fase móvel foi filtrada e levada ao ultrassom para degaseificação antes do uso.

6.1.4 Preparo da solução de tigeciclina SQR

Foram pesados 5 mg de tigeciclina SQR e transferidos para balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi completado com tampão da fase móvel, para a obtenção de solução com concentração de 200,0 µg/mL. Alíquotas desta solução foram transferidas para balões volumétricos para gerar soluções com a concentração final requerida.

6.1.5 Preparo da solução de tigeciclina pó liofilizado

O conteúdo de três frascos contendo 50 mg tigeciclina pó liofilizado foi adicionado a um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras, o equivalente a 2,5 mg de tigeciclina foi pesado e transferido para balão volumétrico de 25 mL. Partindo desta solução, volumes de 7,0 mL foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se soluções com concentração final de 70 µg/mL. O cálculo da concentração e do teor de tigeciclina nas amostras foi realizado através das equações 6.1.1 e 6.1.2, descritas no item 6.1.7.4 deste trabalho.

O peso médio foi realizado com somente 3 frascos de tigeciclina pó liofilizado devido à alta reatividade da tigeciclina com oxigênio e a seu alto custo de aquisição, pois o risco de exposição à degradação, ao abrir a quantidade preconizada de amostras para realização desta etapa de análise, era alto.

6.1.6 Método

Algumas fases móveis utilizadas nos ensaios preliminares estão descritas a seguir:

- A) Ácido acético 0,5 % : acetonitrila (95:5 v/v), vazão de 1,0 mL/min
- B) Ácido acético 0,5 % : metanol (95:5 v/v), vazão de 1,0 mL/min
- C) Ácido oxálico 0,02 M pH 3,0 : acetonitrila (88:12 v/v), vazão de 1,0 mL/min
- D) Ácido fosfórico 0,025 M + EDTA 5mM : acetonitrila (89:11 v/v), vazão de 1,0 mL/min
- E) Ácido fosfórico 0,025 M pH 2,5 : acetonitrila (90:10 v/v), vazão de 1,0 mL/min
- F) Ácido fosfórico 0,025 M pH 3,0 : acetonitrila (89:11v/v), vazão de 1,0 mL/min

- G) Ácido fosfórico 0,025 *M* (pH 3,0, ajustad com trietilamina) : acetonitrila (92:08 v/v), vazão de 1,0 mL/min
- H) Ácido fosfórico 0,025 *M* + ácido oxálico 0,01 *M* (pH 7,0) : metanol: acetonitrila (45:27,5: 27,5 v/v), vazão de 1,0 mL/min
- I) Fosfato de potássio 0,05 *M* pH 7,0: acetonitrila (60:40 v/v), vazão de 1,0 mL/min
- J) Fosfato de sódio monobásico 0,03 *M* pH 2.5: acetonitrila (90:10 v/v), vazão de 1,0 mL/min
- K) Fosfato de sódio monobásico 0,03 *M* pH 2.5: acetonitrila (90:10 v/v), após degradação em solução. HCl 0,1 *M* por 8 horas, sob aquecimento (70 °C), vazão de 1,0 mL/min
- L) Fosfato sódio monobásico 0,03 *M* pH 3,0: acetonitrila (84:16 v/v), vazão de 0,5 mL/min
- M) Fosfato de sódio monobásico 0,01 5*M* + ácido oxálico 0,01 5*M* pH 7,0: acetonitrila (70:30 v/v), vazão de 1,0 mL/min
- N) Fosfato de sódio monobásico 0,015 *M* + ácido oxálico 0,015 *M* pH 7,0: metanol (40:60 v/v), vazão de 1,0 mL/min
- O) Fosfato de sódio monobásico 0,03 *M* pH 6,0: acetonitrila (67: 33 v/v), vazão 0,8 mL/min
- P) Trietilamina 0,4% (pH 7,0 ajustado com ácido fosfórico): acetonitrila (70:30 v/v), vazão de 1,0 mL/min

Os cromatogramas obtidos com os sistemas testados estão descritos nas Figuras 6.1.1 e 6.1.2.

Figura 6.1.1. Cromatogramas de tigeciclina pó liofilizado (70 $\mu\text{g/mL}$) obtidos com diferentes fases móveis: **(A)** ácido acético 0,5 % : acetonitrila (95:5 v/v), **(B)** ácido acético 0,5 % : metanol (95:5 v/v), **(C)** ácido oxálico 0,02 M pH 3,0 : acetonitrila (88:12 v/v), **(D)** ácido fosfórico 0,025 M + EDTA 5mM : acetonitrila (89:11 v/v), **(E)** ácido fosfórico 0,025 M pH 2,5 : acetonitrila (90:10 v/v), **(F)** ácido fosfórico 0,025 M pH 3,0 : acetonitrila (89:11 v/v), **(G)** ácido fosfórico 0,025 M (pH 3,0, ajustado com trietilamina) : acetonitrila (92:08 v/v) e **(H)** ácido fosfórico 0,025 M + ácido oxálico 0,01 M (pH 7,0) : metanol: acetonitrila (45:27,5 : 27,5 v/v)

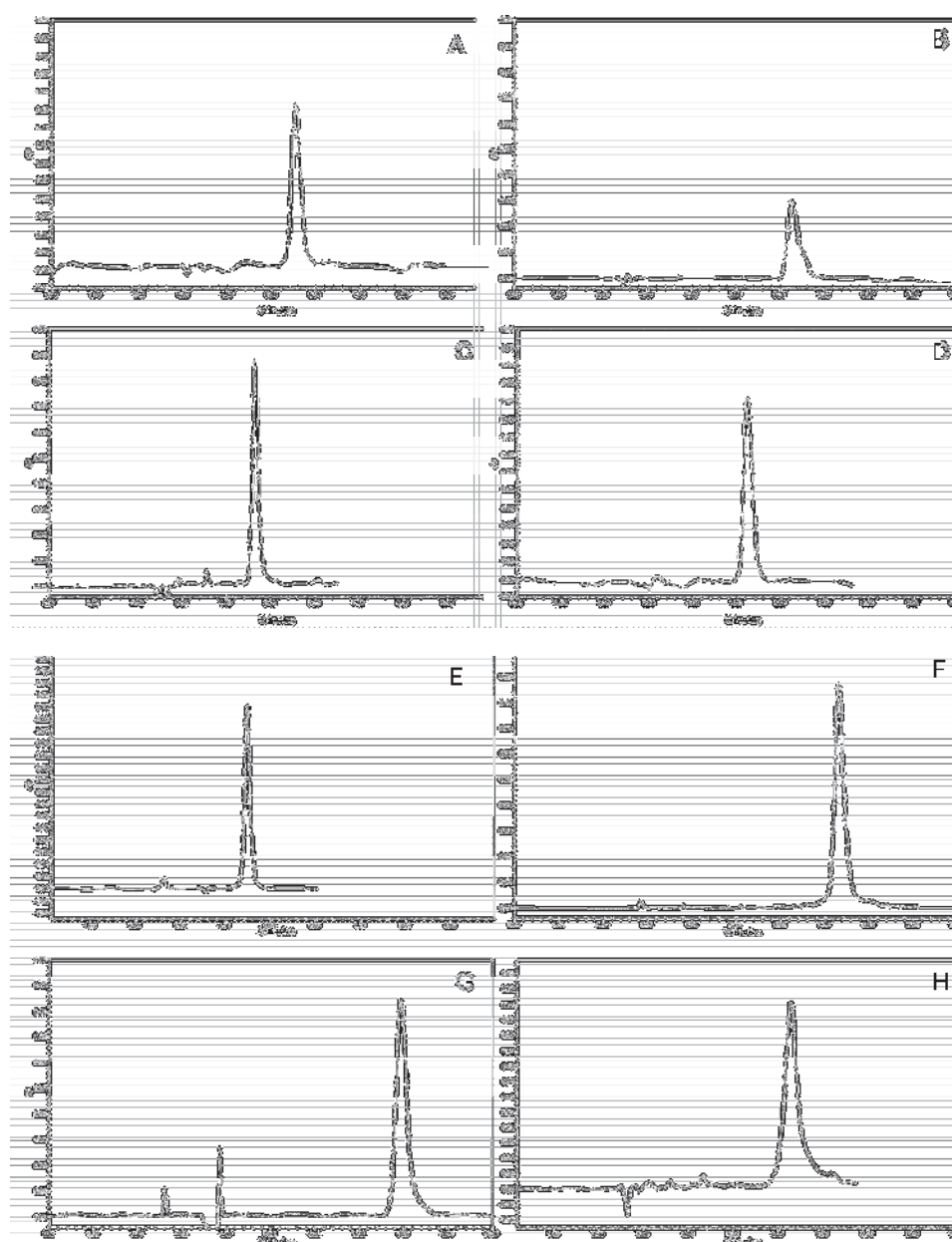
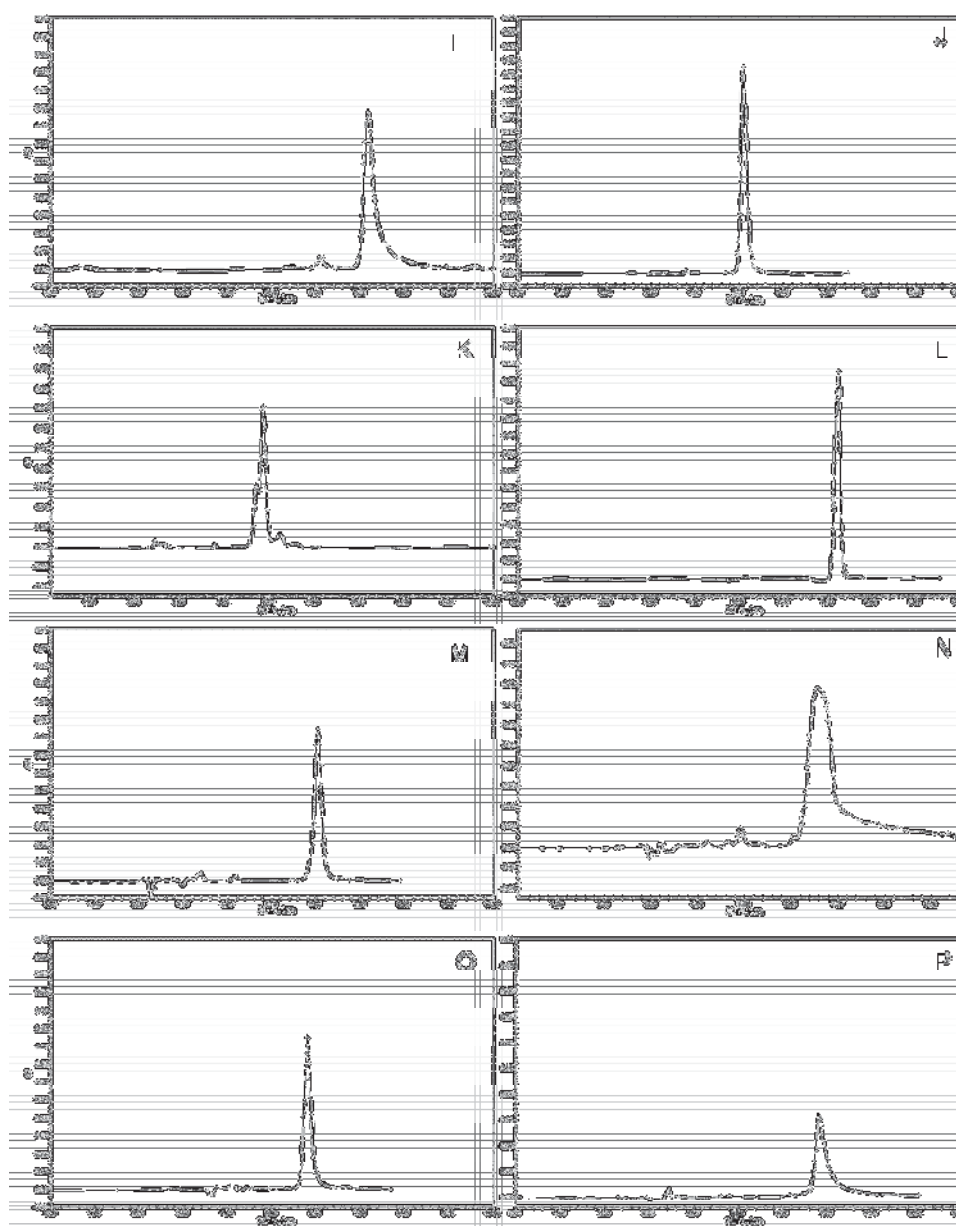


Figura 6.1.2. Cromatogramas de tigeciclina pó liofilizado (70 µg/mL) obtidos com diferentes fases móveis: (I) fosfato de potássio 0,05 M pH 7,0: acetonitrila (60:40 v/v), (J) fosfato de sódio monobásico 0,03 M pH 2.5: acetonitrila (90:10 v/v), (K) fosfato de sódio monobásico 0,03 M pH 2.5: acetonitrila (90:10 v/v), após degradação em solução. HCl 0,1 M por 8 horas, sob aquecimento (70 °C), (L) fosfato de sódio monobásico 0,03 M pH 3,0: acetonitrila (84:16 v/v), vazão de 0,5 mL/min, (M) fosfato de sódio monobásico 0,01 5M + ácido oxálico 0,01 5M pH 7,0: acetonitrila (70:30 v/v), (N) fosfato de sódio monobásico 0,015 M + ácido oxálico 0,015 M pH 7,0: metanol (40:60 v/v), (O) fosfato de sódio monobásico 0,03 M pH 6,0: acetonitrila (67: 33 v/v), vazão 0,8 mL/min e (P) trietilamina 0,4% (pH 7,0 ajustado com ácido fosfórico): acetonitrila (70:30 v/v)



A tigeciclina é um análogo estrutural das tetraciclina, apresentando propriedades químicas similares a este grupo. As tetraciclina formam quelatos com íons metálicos e são adsorvidas nos grupos silanóis presentes nas colunas de fase reversa, dessa forma, é comum as tetraciclina apresentarem picos com cauda. Para evitar a ocorrência de picos assimétricos, fases móveis com vários ácidos (fosfórico, cítrico, tartárico e EDTA) na cromatografia em fase reversa ou cromatografia de troca iônica têm sido utilizadas. Entretanto, mesmo utilizando fases móveis com esses ácidos, em determinadas situações as tetraciclina ainda apresentam picos não satisfatórios e somente fases móveis com ácido oxálico são capazes de melhorar os resultados (OKA, 2000).

A partir dos sistemas testados, foi possível avaliar que o pico da tigeciclina apresenta melhor simetria quando pHs mais baixos foram utilizados, porém em alguns casos (A, C, D, G), observou-se irregularidades na linha de base e pouca estabilidade de tempo de retenção. A simetria do pico piorou quando metanol e pHs mais altos foram utilizados. Ao se utilizar a fase móvel J - fosfato de sódio monobásico 0,03 M pH 2.5: Acetonitrila (90:10 v/v)- obteve-se pico com boa configuração, entretanto não houve separação dos produtos de degradação gerados a partir de degradação ácida. A fase móvel contendo tampão fosfato de sódio e ácido oxálico (pH 7,0) e acetonitrila foi selecionada devido a fornecer performance cromatográfica melhor e características do pico aceitáveis, incluindo fator de cauda, número de pratos teóricos e fator de capacidade. O comprimento de onda de detecção do método foi avaliado na faixa de 200 a 400 nm, obtendo-se comprimento de onda de máxima absorção da tigeciclina a 247 nm, porém nessa região do espectro o ácido oxálico também apresenta boa absorvidade. Assim, selecionou-se 280 nm, que também é um dos máximos de absorção da tigeciclina, para obtenção de uma melhor relação sinal/ruído para o método desenvolvido.

As condições cromatográficas otimizadas para a determinação de tigeciclina em pó liofilizado estão apresentadas na Tabela 6.1.1.

Tabela 6.1.1. Parâmetros otimizados para a determinação de tigeciclina em pó liofilizado pelo método CLAE

Parâmetros	Descrição
Fase móvel	Fosfato de sódio monobásico 0,015 <i>M</i> + ácido oxálico 0,015 <i>M</i> (pH 7,0): acetonitrila (75:25 v/v)
Coluna	Luna C ₁₈ Phenomenex (250 x 4,6 mm) 5 µm
Deteção	280 nm
Vazão	1 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25 ± 2 °C
Tempo de retenção	8,6 minutos

6.1.7 Validação do método analítico por CLAE

A validação do método foi conduzida de acordo com o procedimento preconizado pela literatura (ICH, 2005; USP 33, 2010). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

6.1.7.1 Especificidade

A especificidade é a habilidade de um método analítico medir a resposta do analito na presença de suas potenciais impurezas (ICH, 2005). A capacidade indicadora de estabilidade do método foi determinada submetendo a solução amostra de tigeciclina (150 µg/mL) à degradação acelerada por condições ácida, básica, neutra, oxidativa e fotolítica (luz UVC- 254 nm) para avaliar a interferência na quantificação de tigeciclina. Depois dos procedimentos de degradação as amostras foram diluídas em tampão da fase móvel para concentração final de 70 µg/mL. A solução da amostra foi preparada em HCl 0,1 *M* e NaOH 0,1 *M* na hidrólise ácida e básica, respectivamente. Ambas as soluções foram aquecidas a 70 °C, resfriadas e neutralizadas. Para estudo da condição neutra, a amostra dissolvida em água foi aquecida a 70 °C. A degradação oxidativa foi induzida dissolvendo a amostra em solução de peróxido de hidrogênio 3%, mantendo

por 15 minutos a temperatura ambiente. A fotodegradação foi induzida expondo as amostras à luz ultravioleta (200 W h m^{-2}) por 48 horas. As hidrólises neutra, ácida e básica também foram avaliadas a temperatura ambiente. Além disso, uma solução do adjuvante da formulação farmacêutica foi analisada pelo método.

Adicionalmente, a solução de tigeciclina SQR e as soluções de amostra degradadas foram analisadas por LC-MS.

6.1.7.2 Linearidade

Para a curva analítica foi preparado uma solução de tigeciclina SQR na concentração de $200 \mu\text{g/mL}$ (solução-mãe). A partir da solução-mãe, transferiram-se alíquotas de 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5 e 2,0 mL para balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se concentrações de 100, 90, 80, 70, 60, 50 e $40 \mu\text{g/mL}$. Todas as soluções foram preparadas no tampão da fase móvel. As curvas foram preparadas e analisadas durante três dias. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e calculada a análise de variância (ANOVA), avaliando-se a validade dos parâmetros estatísticos.

6.1.7.3 Precisão

Avaliou-se a precisão do método através do cálculo do Desvio Padrão Relativo percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. Paralelamente, foi analisada a solução de tigeciclina SQR na concentração de $70 \mu\text{g/mL}$. O valor de Desvio Padrão Relativo percentual adotado como aceitável foi $\leq 2,0 \%$.

6.1.7.3.1 Repetibilidade

Prepararam-se amostras para obtenção de soluções com concentrações de $70 \mu\text{g/mL}$ e realizaram-se seis determinações sucessivas no mesmo dia. Deste modo, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista.

6.1.7.3.2 Precisão intermediária

Avaliou-se a precisão intermediária através de análises executadas por diferentes analistas e em diferentes dias, usando os mesmos lotes de amostras e método, na concentração de 70 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicata.

6.1.7.3.2.1 Interdias

Prepararam-se, diariamente, duas amostras, na concentração de 70 µg/mL, e analisaram-se triplicata em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais.

6.1.7.3.2.2 Entre-analistas

Prepararam-se duas amostras, na concentração de 70 µg/mL, as quais foram analisadas em triplicata, por dois analistas, sob as mesmas condições experimentais.

6.1.7.4 Cálculos

A concentração de tigeciclina nas amostras foi obtida através da equação 6.1.1:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Equação 6.1.1

Em que:

A_A = Área média absoluta das amostras

A_{SQR} = Área média absoluta da SQR

C_A = Concentração de tigeciclina na amostra

C_{SQR} = Concentração da SQR

O valor percentual de tigeciclina nas amostras foi calculado pela equação 6.1.2:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Equação 6.1.2

Em que:

$C_A\%$ = Concentração percentual da amostra

C_A = Concentração de tigeciclina encontrado na amostra

C_T = Concentração teórica de tigeciclina na amostra

6.1.7.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidade conhecida de padrão foi adicionada à amostra. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 6.1.2, em triplicata.

Tabela 6.1.2. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico

	Tigeciclina amostra (100 µg/mL) (mL)	Tigeciclina SQR (100 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)*
Amostra	4,0	-	40
R1	4,0	1,6	56
R2	4,0	3,0	70
R3	4,0	4,4	84
Padrão	-	4,0	40

*Balão volumétrico de 10 mL

A percentagem de tigeciclina recuperada foi calculada pela equação 6.1.3:

$$\%R = [(C_R - C_A)/C_P] \times 100$$

Equação 6.1.3

em que:

C_R = concentração encontrada da solução amostra adicionada de SQR ($\mu\text{g/mL}$)

C_A = concentração encontrada da amostra ($\mu\text{g/mL}$)

C_P = concentração teórica adicionada da solução da SQR ($\mu\text{g/mL}$)

6.1.7.6 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em triplicata. A fórmula usada para o cálculo está representada na Equação 6.1.4.

$$LD = \frac{3.3 \sigma}{IC}$$

Equação 6.1.4

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

6.1.7.7 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em triplicata. O cálculo foi realizado segundo a Equação 6.1.5.

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

Equação 6.1.5

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

6.1.7.8 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada através de modificações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: fabricante da coluna: Phenomenex e Waters; pH do tampão da fase móvel: 6,5, 7,0 e 7,5; vazão da fase móvel: 0,8, 1,0 e 1,2 mL; concentração de acetonitrila na fase móvel: 22, 25 e 28%; comprimento de onda de detecção: 275, 280 e 285 nm; fabricante do solvente orgânico: J. T. Baker e Tedia e concentração do tampão da fase móvel: 0,012, 0,015 e 0,018 M. Realizou-se a análise do teor de tigeciclina nas diferentes condições, avaliando as alterações de modo isolado e simultâneo, aplicando o Teste de Youden. O teste de Youden constitui um método confiável para avaliação de robustez de métodos analíticos, por meio de delineamento que envolve seis parâmetros analíticos combinados em oito experimentos (CESAR e PIANETTI, 2009). Foram realizados dois testes independentes, utilizando variações dos parâmetros analíticos para valores maiores e menores, respectivamente. Na Tabela 6.1.3 é apresentada a combinação fatorial utilizada no teste, em que letras maiúsculas referem-se às condições normais do método analítico e letras minúsculas às alterações dos parâmetros analíticos.

Tabela 6.1.3. Combinação fatorial de parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo Teste de Youden

Parâmetro Analítico	Combinação Fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Fabricante da Coluna	A	A	A	A	a	a	a	A
pH do tampão	B	B	b	B	B	B	b	B
Vazão	C	C	C	C	C	c	C	C
Concentração de acetonitrila na fase móvel	D	D	d	D	d	d	D	D
Comprimento de onda	E	E	E	E	e	E	e	E
Fabricante da acetonitrila	F	F	f	F	F	f	f	F
Concentração do tampão	G	G	g	G	g	G	G	G
Resultado	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

As condições dos testes de Youden 1 e 2, com variações dos parâmetros analíticos para valores maiores e menores, são apresentadas nas tabelas 6.1.4 e 6.1.5, respectivamente.

Tabela 6.1.4. Parâmetros analíticos e variações efetuadas no teste de Youden 1

Parâmetro		Condição normal			Variação		
A/a	Marca da coluna	Phenomenex [®]	-	A	Waters [®]	-	a
B/b	pH do tampão	7,0	-	B	7,5	-	b
C/c	Vazão	1 mL/min	-	C	1,2 mL/min	-	c
D/d	Acetonitrila	25%	-	D	28%	-	d
E/e	Comprimento de onda	280 nm	-	E	285 nm	-	e
F/f	Marca da acetonitrila	J.T. Baker	-	F	Tedia	-	f
G/g	Concentração tampão	0,015 M	-	G	0,018 M	-	g

Tabela 6.1.5. Parâmetros analíticos e variações efetuadas no teste de Youden 2

Parâmetro		Condição normal		Variação	
A/a	Marca da coluna	Phenomenex [®]	- A	Waters [®]	- a
B/b	pH do tampão	7,0	- B	6,5	- b
C/c	Vazão	1 mL/min	- C	0,8 mL/min	- c
D/d	Acetonitrila	25%	- D	22%	- d
E/e	Comprimento de onda	280 nm	- E	275 nm	- e
F/f	Marca da acetonitrila	J.T. Baker	- F	Tedia	- f
G/g	Concentração tampão	0,015 M	- G	0,012 M	- g

Para determinar a influência das variações de cada parâmetro no resultado final, a média de quatro doseamentos correspondentes a letras maiúsculas (condições normais) foi comparada à média de quatro outros doseamentos correspondentes a letras minúsculas (condições alteradas). A Equação 6.1.6 exemplifica a avaliação do efeito da mudança do fabricante da coluna cromatográfica.

$$\text{Efeito A/a} = \frac{s + t + u + v}{4} - \frac{w + x + y + z}{4}$$

Equação 6.1.6

em que:

s, t, u e v = teores das amostras determinados com a coluna utilizada no método

w, x, y e z = teores das amostras determinados com a coluna de fabricante diferente

A interpretação do teste foi realizada através da comparação do valor obtido na equação 6.1.6 com o valor resultante da Equação 6.1.7 (BEDREGAL et al., 2008):

$$\text{Valor de referência: } S \sqrt{2}$$

Equação 6.1.7

em que:

S = desvio padrão dos oito teores (s, t, u, v, w, x, y, z) da amostra analisada no teste

O valor encontrado na Equação 6.1.6 deve ser menor que o valor determinado na equação 6.1.7 para que o efeito seja interpretado como não significativo.

6.1.7.9 Teste de performance do sistema cromatográfico

Para assegurar o desempenho do cromatógrafo a líquido antes e durante a realização das análises, efetuaram-se seis injeções de tigeciclina SQR na concentração de 70 µg/mL, avaliando o Desvio Padrão Relativo percentual dos parâmetros de fator de capacidade (Equação 6.1.8), simetria do pico (Equação 6.1.9), número de pratos teóricos (Equação 6.1.10), tempo de retenção e área do pico do padrão.

6.1.7.9.1 Fator de Capacidade

$$K = \frac{T_r}{V_o} - 1,0$$

Equação 6.1.8

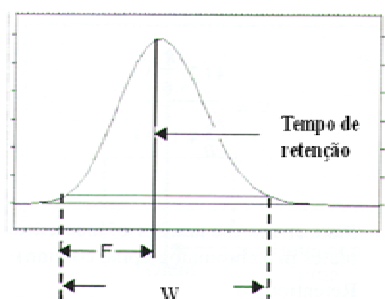
em que :

K = Fator de capacidade

T_r = Tempo de retenção

V_0 = Tempo do volume de retardamento

6.1.7.9.2 Fator de Assimetria



$$T = \frac{W}{2 \times F}$$

Equação 6.1.9

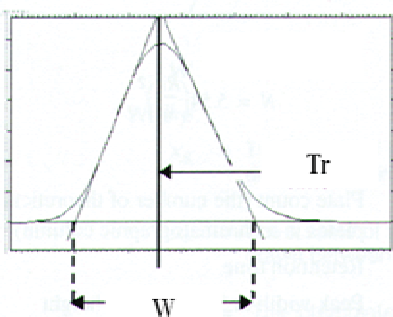
em que :

T = Fator de simetria

W = Largura do pico a 5% da altura

F = Tempo do início da largura do pico a 5% de altura até o tempo de retenção (Tr)

6.1.7.9.3 Número de Pratos Teóricos



$$N = 16 \left(\frac{Tr}{W} \right)^2$$

Equação 6.1.10

em que :

N = número de pratos teóricos

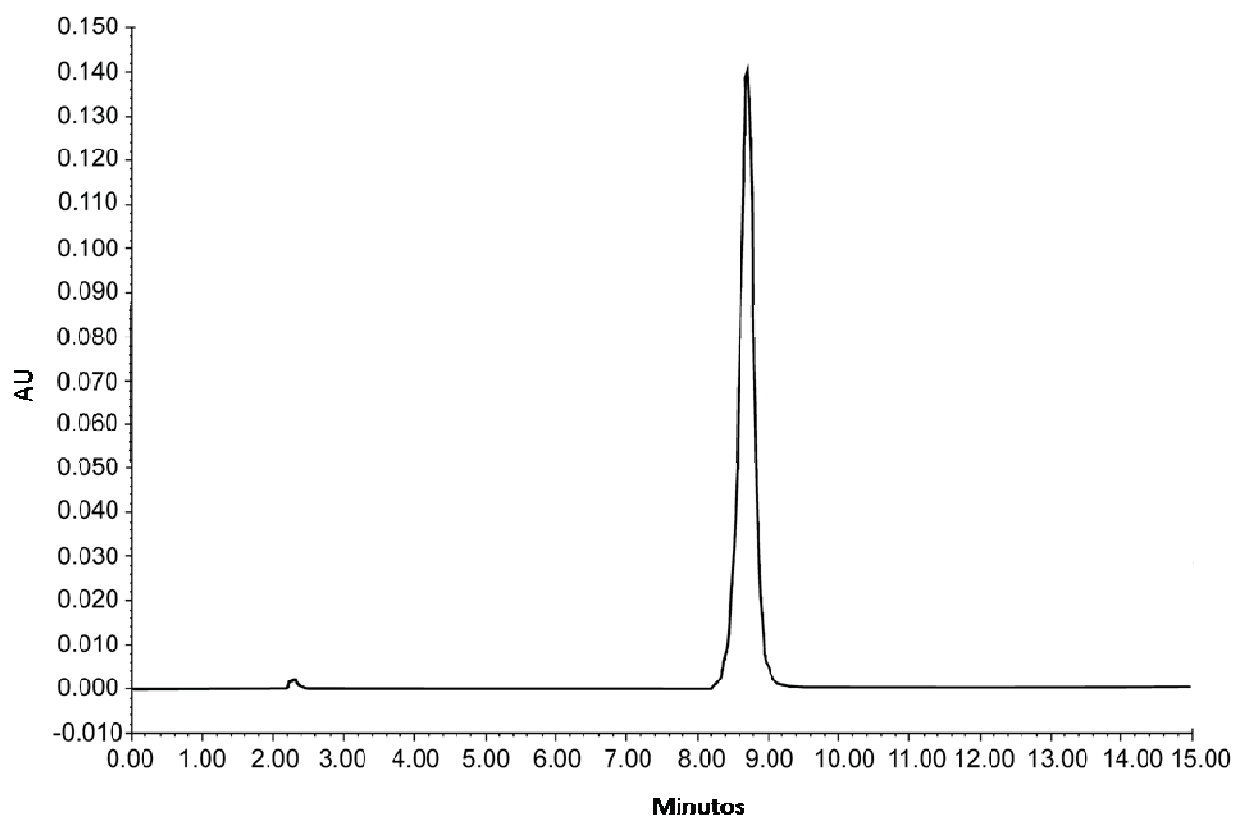
Tr = Tempo de retenção

W = Largura do pico na linha de base, determinada pela tangente do pico

6.1.8 Resultados

O cromatograma típico obtido pelo método proposto, demonstrando a resolução e a simetria do pico correspondente à tigeciclina é mostrado na Figura 6.1.3. O tempo de retenção observado (8,6 minutos) permitiu rápida determinação do fármaco, permitindo a sua aplicação em controle de qualidade.

Figura 6.1.3. Cromatograma típico de tigeciclina SQR (70 $\mu\text{g/mL}$) obtido pelo método cromatográfico proposto. Fase móvel: fosfato de sódio monobásico 0,015 M + ácido oxálico 0,015 M (pH 7,0); acetonitrila (75:25 v/v). Fase estacionária: Luna C₁₈ Phenomenex (250 x 4,6 mm) 5 μm . Vazão 1 mL/min. Comprimento de onda de detecção: 280 nm



6.1.8.1 Especificidade e estudos de degradação forçada

A degradação forçada foi realizada para estudo das propriedades indicadoras de estabilidade do método analítico, particularmente quando não há informação disponível sobre os produtos de degradação potenciais. As Figuras 6.1.4, 6.1.5, 6.1.6, 6.1.7 e 6.1.8 mostram os cromatogramas obtidos após as degradações básica, ácida, neutra, oxidativa e fotolítica, respectivamente, com picos correspondentes aos produtos de degradações bem resolvidos do pico principal da tigeciclina (tempo de retenção: 8,6 minutos). Assim, demonstrou-se a especificidade do método proposto para a análise de produto farmacêutico de tigeciclina.

Figura 6.1.4. Cromatograma da degradação de tigeciclina (70 µg/mL) em meio básico (NaOH 0,1 M) após 5 horas a 70 °C. Fase móvel: fosfato de sódio monobásico 0,015 M + ácido oxálico 0,015 M (pH 7,0): acetonitrila (75:25 v/v). Fase estacionária: Luna C18 Phenomenex (250 x 4,6 mm) 5 µm. Vazão 1 mL/min. Comprimento de onda de detecção: 280 nm

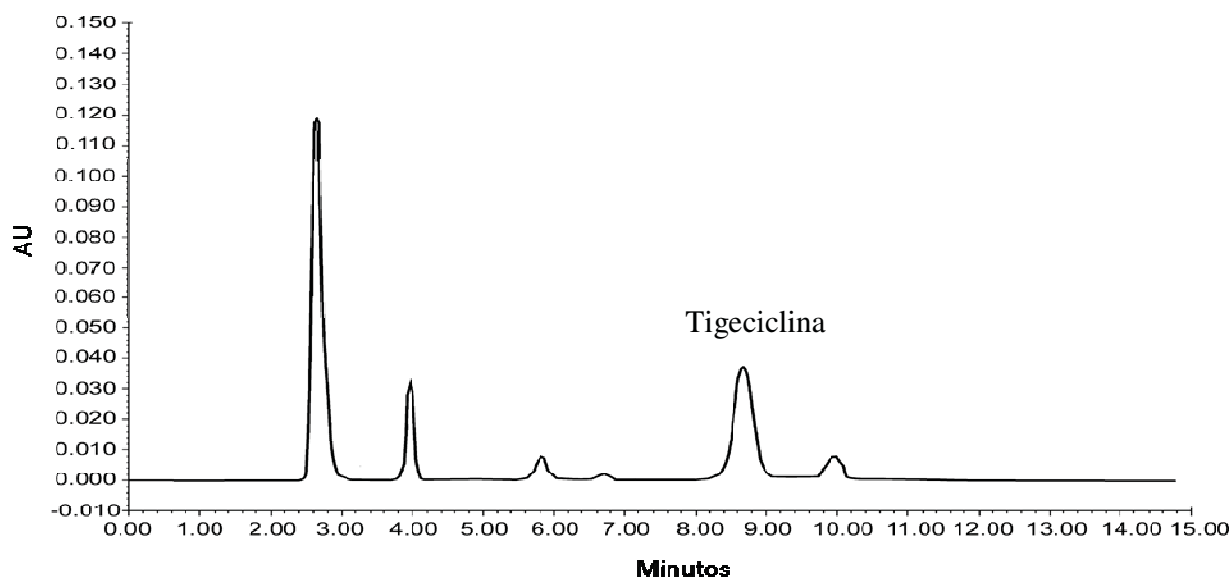


Figura 6.1.5. Cromatograma da degradação de tigeciclina (70 $\mu\text{g/mL}$) em meio ácido (HCl 0,1 *M*) após 5 horas a 70 °C. Fase móvel: fosfato de sódio monobásico 0,015 *M* + ácido oxálico 0,015 *M* (pH 7,0): acetonitrila (75:25 v/v). Fase estacionária: Luna C18 Phenomenex (250 x 4,6 mm) 5 μm . Vazão 1 mL/min. Comprimento de onda de detecção: 280 nm

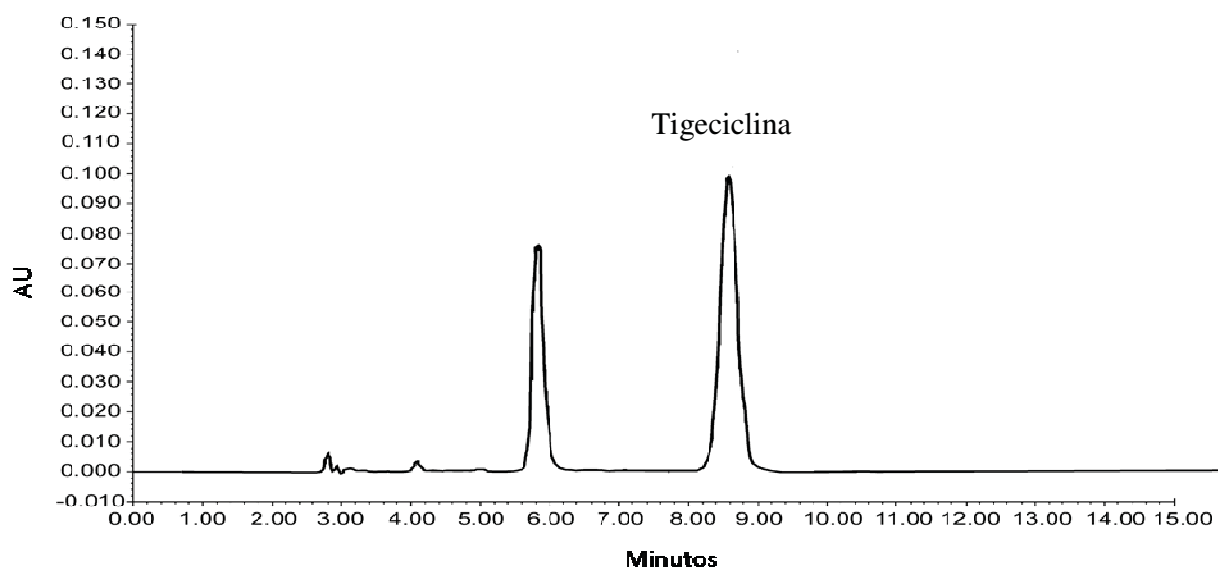


Figura 6.1.6. Cromatograma da degradação de tigeciclina (70 $\mu\text{g/mL}$) em meio neutro (água) após 7 horas a 70 °C. Fase móvel: fosfato de sódio monobásico 0,015 *M* + ácido oxálico 0,015 *M* (pH 7,0): acetonitrila (75:25 v/v). Fase estacionária: Luna C18 Phenomenex (250 x 4,6 mm) 5 μm . Vazão 1 mL/min. Comprimento de onda de detecção: 280 nm

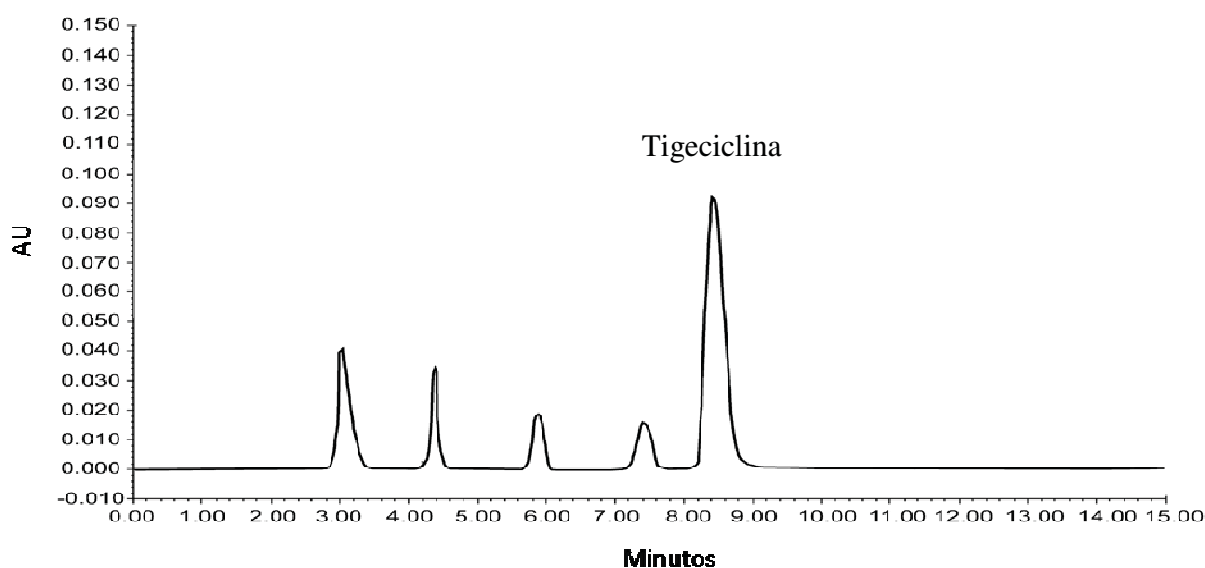


Figura 6.1.7. Cromatograma da degradação de tigeciclina (70 $\mu\text{g/mL}$) em meio oxidativo (peróxido de hidrogênio 3%) após 15 minutos. Fase móvel: fosfato de sódio monobásico 0,015 *M* + ácido oxálico 0,015 *M* (pH 7,0): acetonitrila (75:25 v/v). Fase estacionária: Luna C18 Phenomenex (250 x 4,6 mm) 5 μm . Vazão 1 mL/min. Comprimento de onda de detecção: 280 nm

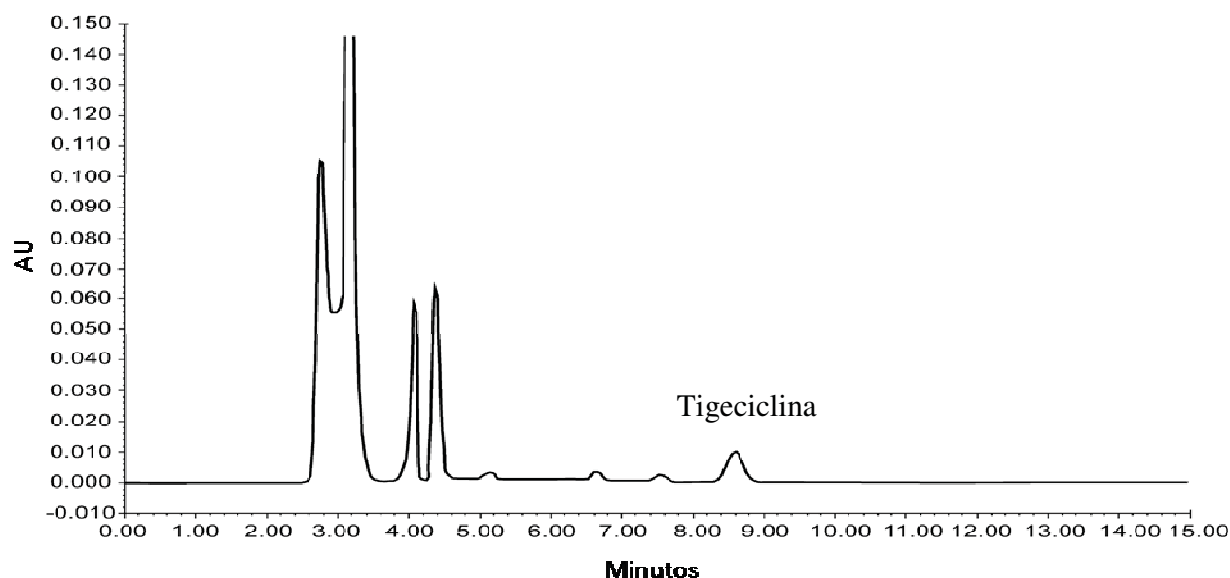
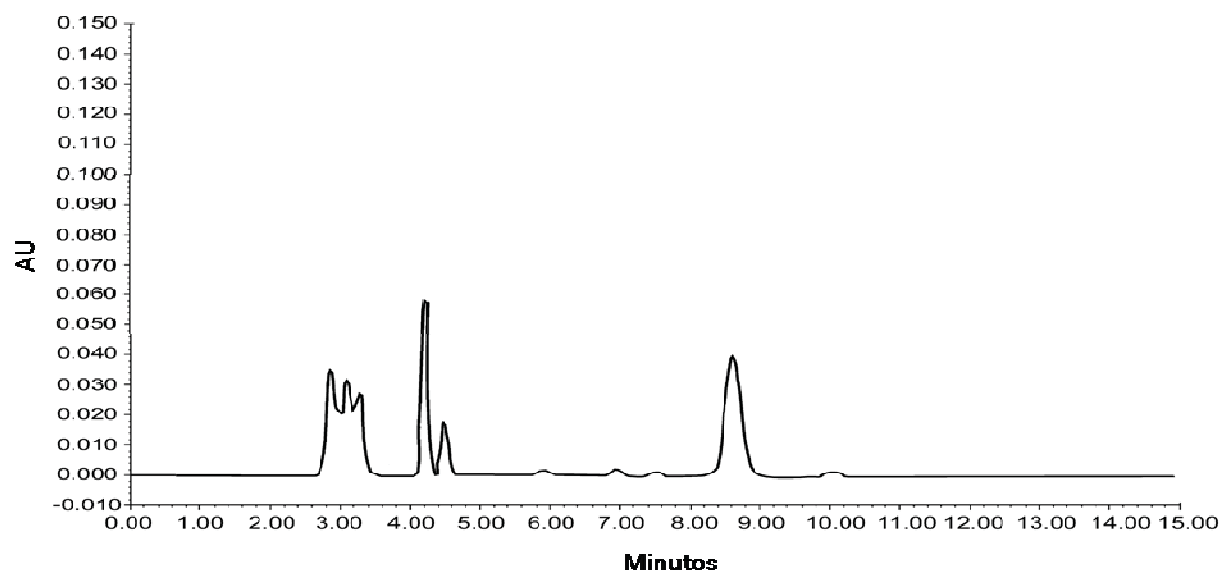


Figura 6.1.8. Cromatograma da degradação de tigeciclina (70 $\mu\text{g/mL}$) na luz UVC- 254 nm após 24 horas. Fase móvel: fosfato de sódio monobásico 0,015 *M* + ácido oxálico 0,015 *M* (pH 7,0): acetonitrila (75:25 v/v). Fase estacionária: Luna C18 Phenomenex (250 x 4,6 mm) 5 μm . Vazão 1 mL/min. Comprimento de onda de detecção: 280 nm



6.1.8.2 Linearidade

Na Tabela 6.1.6 são apresentados os valores das áreas obtidas pelas diferentes concentrações de tigeciclina SQR.

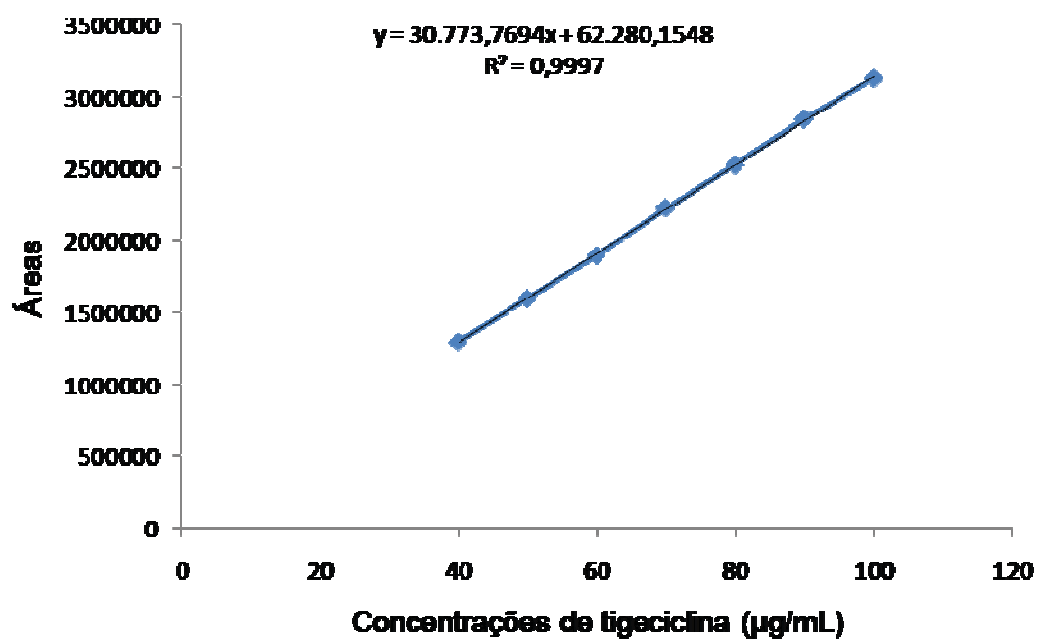
Tabela 6.1.6. Valores das áreas referentes ao pico de tigeciclina SQR para construção da curva analítica do método cromatográfico

Concentração (µg/mL)	Áreas ^a (AU)	Área média ± DP ^b	DPR ^c (%)
40	1298639	1296029 ± 5300,334	0,41
	1299518		
	1289929		
50	1608809	1598111 ± 14075,24	0,88
	1603358		
	1582166		
60	1890878	189596 ± 16613,08	0,88
	1914527		
	1882490		
70	2233663	2226975 ± 20822,62	0,93
	2243632		
	2203630		
80	2532082	2525572 ± 6889,5	0,27
	2526278		
	2518357		
90	2849489	2846011 ± 14333,81	0,50
	2858286		
	2830258		
100	3166189	3126445 ± 42978,45	1,37
	3132311		
	3080835		

^aValor médio de três determinações/ ^bDP = Desvio padrão/ ^cDPR (%)= Desvio Padrão Relativo percentual

Cada valor médio das áreas absolutas obtidas na determinação da curva analítica foram plotados em relação à respectiva concentração, observando-se linearidade adequada na faixa de 40-100 µg/mL, conforme ilustrado na Figura 6.1.9.

Figura 6.1.9. Curva analítica de tigeciclina SQR obtida pelo método cromatográfico



Para análise de regressão e desvio de linearidade das curvas analíticas de tigeciclina SQR, aplicou-se o teste ANOVA. Os resultados calculados estão descritos na Tabela 6.1.7.

Tabela 6.1.7. Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de tigeciclina SQR, utilizando o método por CLAE

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	6	7957001958961	1326166993160	3057,85*	2,85
Regressão linear	1	7955009035075	7955009035075	18342,48*	4,6
Desvio da linearidade	5	1992923887	398584777	0,92	2,96
Resíduo	14	6071704208	433693158		
Total	20	7963073663169			

*Significativo para $p < 0,05\%$

6.1.8.3 Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base no Desvio Padrão Relativo. Seis soluções de tigeciclina SQR preparadas na concentração de 70 µg/mL foram submetidas a análises sucessivas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram DPR de 1,12%.

Para a determinação da precisão interdias realizaram-se análises de duas amostras, em três dias consecutivos, obtendo-se valores experimentais de teores médios de 110,72 e 123,24%, com DPR de 0,62 e 1,26%, respectivamente. Na precisão entre-analistas, duas amostras foram avaliadas por dois analistas, obtendo-se valores experimentais médios de 110,91 e 122,98%, com DPR de 1,11 e 1,84%, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 6.1.8.

Tabela 6.1.8. Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método analítico para análise de tigeciclina por CLAE

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre-analistas		
		Teor ^a (mg/frasco)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)		Teor ^a (mg/frasco)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)
1	1	58,32	110,04		A	58,32	110,04	1,11
	2	55,68	110,71	0,62	B	59,24	111,78	
	3	59,05	111,41					
2	1	65,51	123,61		A	66,03	124,58	1,84
	2	66,03	124,58	1,26	B	64,33	121,37	
	3	64,42	121,54					

^a média de três determinações

^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

6.1.8.4 Exatidão

Determinou-se também, a exatidão do método, através da análise de três concentrações na faixa pré-estabelecida e os resultados experimentais, que correspondem à porcentagem média de 99,01%, encontram-se na Tabela 6.1.9.

Tabela 6.1.9. Determinação da exatidão do método analítico para análise tigeciclina por CLAE

	Tigeciclina SQR adicionado (µg/mL)	Tigeciclina SQR encontrado^a (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR^b (%)
R1	16	15,71	98,21		
R2	30	30,09	100,31	99,01	1,14
R3	44	43,35	98,52		

^a média de três determinações^bDPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

6.1.8.5 Limites de detecção e de quantificação

A sensibilidade do método cromatográfico foi determinada através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O valor calculado para a menor concentração detectada pelo processo analítico foi 1,67 µg/mL. Por sua vez, o LQ calculado foi 5,05 µg/mL e o encontrado experimentalmente, com DPR menor que 5%, foi de 2,5 µg/mL.

6.1.8.6 Robustez

Na avaliação da robustez pelo teste de Youden, realizaram-se dois testes independentes e aplicaram-se as equações 6.1.6 e 6.1.7 para avaliação da significância dos efeitos. Os resultados obtidos nos testes de Youden 1 e 2 são apresentados na Tabela 6.1.10. Os valores de referência obtidos na equação 6.1.7 foram 2,23 e 1,75 para os Testes 1 e 2, respectivamente, de modo que qualquer valor acima destes, foi considerado significativo.

Tabela 6.1.10. Resultados de cada variação obtidos nos Testes de Youden 1 e 2

Teste de Youden 1		Teste de Youden 2	
Efeito	Teor (%) ^{a,b}	Efeito	Teor (%) ^{a,b}
Marca da coluna (A = Phenomenex [®] ; a = Waters [®])	109,35 – 108,38 = 0,98	Marca da coluna (A = Phenomenex [®] ; a = Waters [®])	110,74 – 111,77 = -1,03
pH do tampão (B = 7,0; b = 7,5)	108,67 – 109,06 = -0,39	pH do tampão (B = 7,0; b = 6,5)	111,23 – 111,28 = -0,05
Vazão (mL/min) (C = 1; c = 1,2)	108,86 – 108,87 = -0,01	Vazão (mL/min) (C = 1; c = 0,8)	110,97 – 111,53 = -0,56
Acetonitrila (%) (D = 25; d = 28)	109,86 – 107,87 = 1,99	Acetonitrila (%) (D = 25; d = 22)	110,70 – 111,81 = -1,11
Comprimento de onda (nm) (E = 280, e = 285)	108,35 – 109,38 = -1,03	Comprimento de onda (nm) (E = 280, e = 275)	111,32 – 111,19 = 0,13
Marca da acetonitrila (F = J.T. Baker; f = Tedia)	108,32 – 109,41 = -1,10	Marca da acetonitrila (F = J.T. Baker; f = Tedia)	111,73 – 110,77 = 0,96
Concentração do tampão (M) (G = 0,015; g = 0,018)	109,46 – 108,27 = 1,19	Concentração do tampão (M) (G = 0,015; g = 0,012)	110,58 – 111,93 = -1,35

^a Média de teores obtidos nas condições normais - Média de teores obtidos nas condições alteradas

^b Critérios de referência calculados: 2,23 (Teste 1) e 1,75 (Teste 2)

Avaliou-se também a robustez através de pequenas modificações nos parâmetros do método, tais como: marca da coluna, pH, vazão, composição e concentração do tampão da fase móvel, comprimento de onda e marca do solvente. Na execução de análises de produtos farmacêuticos sob parâmetros alterados de modo isolado, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os coeficientes de variação foram inferiores a 0,83%, comprovando a robustez do método proposto, frente aos parâmetros avaliados, conforme mostra a Tabela 6.1.11.

Tabela 6.1.11. Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise de tigeciclina por CLAE

Variável	Faixa Investigada	Tigeciclina ^a (mg /frasco)	Tigeciclina ^a (%)	DPR ^b (%)
Marca da coluna	Luna C ₁₈ Phenomenex® (250 x 4,6 mm) 5 µm	58,14	109,69	0,75
	Symmetry Waters® (250 x 4,6 mm) 5 µm	58,76	110,86	
pH do tampão	6,5	58,55	110,47	0,55
	7,0	58,33	110,06	
	7,5	58,96	111,25	
Vazão (mL/min)	0,8	57,96	109,36	0,26
	1,0	57,70	108,86	
	1,2	57,94	109,32	
Acetonitrila (%)	22	58,91	111,15	0,61
	25	58,33	110,06	
	28	58,99	111,30	
Concentração do tampão (M)	0,012	58,41	110,20	0,42
	0,015	58,33	110,06	
	0,018	58,79	110,93	
Comprimento de onda (nm)	275	58,89	111,12	0,83
	280	58,33	110,06	
	285	59,31	111,91	
Marca do solvente	J. T. Baker	58,33	110,06	0,53
	Tedia	57,90	109,25	

^a média de três determinações^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

6.1.8.7 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Verificou-se a adequabilidade do sistema cromatográfico pela análise quantitativa, através do cálculo dos coeficientes de variação da assimetria do pico, fator de capacidade, número de pratos teóricos da coluna, tempo de retenção e área do pico principal de seis replicatas de tigeciclina SQR. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6.1.12.

Tabela 6.1.12. Parâmetros avaliados na análise de adequabilidade do sistema cromatográfico desenvolvido para análise de tigeciclina

Parâmetros avaliados					
	Assimetria	Fator de Capacidade	Pratos teóricos	Tempo de retenção (min)	Área
	1,16	2,74	7558,13	8,65	2184285
	1,16	2,86	7478,60	8,67	2165824
	1,12	2,84	7566,77	8,71	2141933
	1,16	2,83	7540,88	8,70	2114839
	1,16	2,75	7530,37	8,72	2142539
	1,15	2,84	7456,16	8,71	2162706
Média	1,15	2,81	7521,82	8,69	2152021
DPR ^a (%)	1,39	1,83	0,59	0,31	1,12

^a DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual.

6.1.9 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massas (LC-MS)

As soluções de tigeciclina degradadas para o estudo de especificidade do método por cromatografia em fase reversa foram também analisadas por espectroscopia de massas. A análise foi realizada para determinação das massas dos compostos formados a partir das degradações, contribuindo para uma posterior identificação destes produtos, os quais até o momento não são relatados na literatura científica.

6.1.9.1 Material

As análises por LC-MS foram realizadas no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP- Araraquara, utilizando o equipamento espectrômetro de massas Ion trap (Thermo Scientific, Florida, USA), model LCQ Fleet, equipado com fonte de ionização eletrospray, operando em modo positivo e configurado para modo scan. As massas das bandas foram determinadas automaticamente usando o programa de software Xcalibur V.

6.1.9.2 Método

As condições do sistema LC-MS foram otimizadas com volume de injeção de 20 μL da solução amostra de tigeciclina (70 $\mu\text{g/mL}$), usando coluna cromatográfica Luna C₁₈ Phenomenex (250 x 4,6 mm) 5 μm . O sistema foi operado isocraticamente à temperatura ambiente, usando fase móvel composta por acetonitrila:metanol:água:ácido fórmico (12:8:80:0,05) v/v/v/v com adição de acetato de amônio (4 mM) e vazão de 0,5 mL/min. Os melhores resultados foram obtidos utilizando voltagem do capilar de *eletrospray* de 2,0 V, temperatura do capilar de 275 °C, vazão do gás auxiliar (N₂) de 10 un e voltagem de *spray* de 5 kV. As leituras por espectrometria de massas foram obtidas na faixa de relação m/z entre 100 e 750 amu.

6.1.9.3 Resultados

As Figuras 6.1.10 a 6.1.15 mostra o espectro de massas da solução de amostra de tigeciclina intacta e após degradações ácida, básica, fotolítica, oxidativa e neutra.

Figura 6.1.10 Espectro de massas da tigeciclina em pó liofilizado: (A) solução amostra de tigeciclina intacta

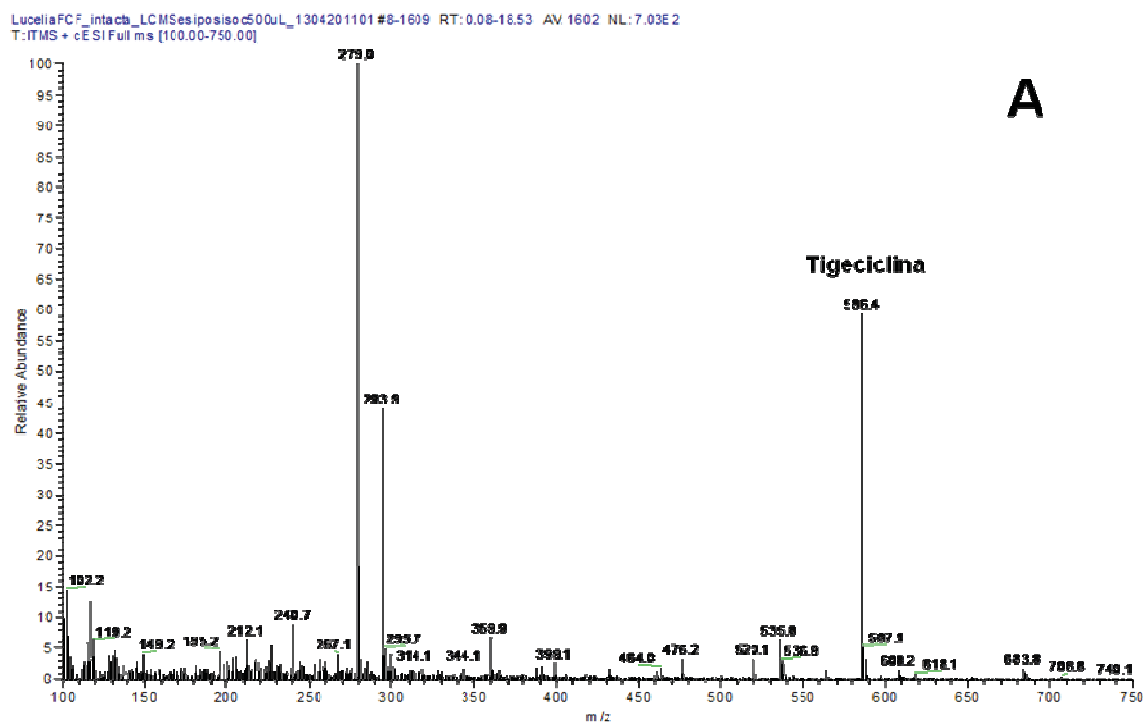


Figura 6.1.11 Espectro de massas da tigeciclina em pó liofilizado: (B) após degradação ácida

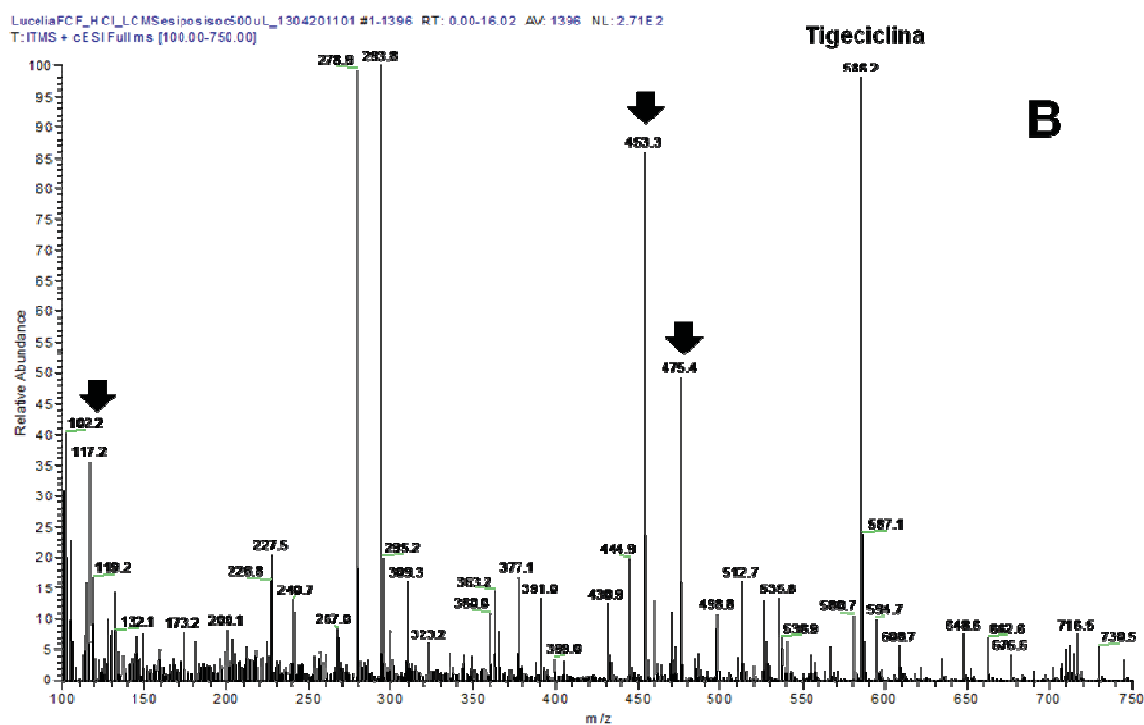


Figura 6.1.12 Espectro de massas da tigeciclina em pó liofilizado: (C) após degradação básica

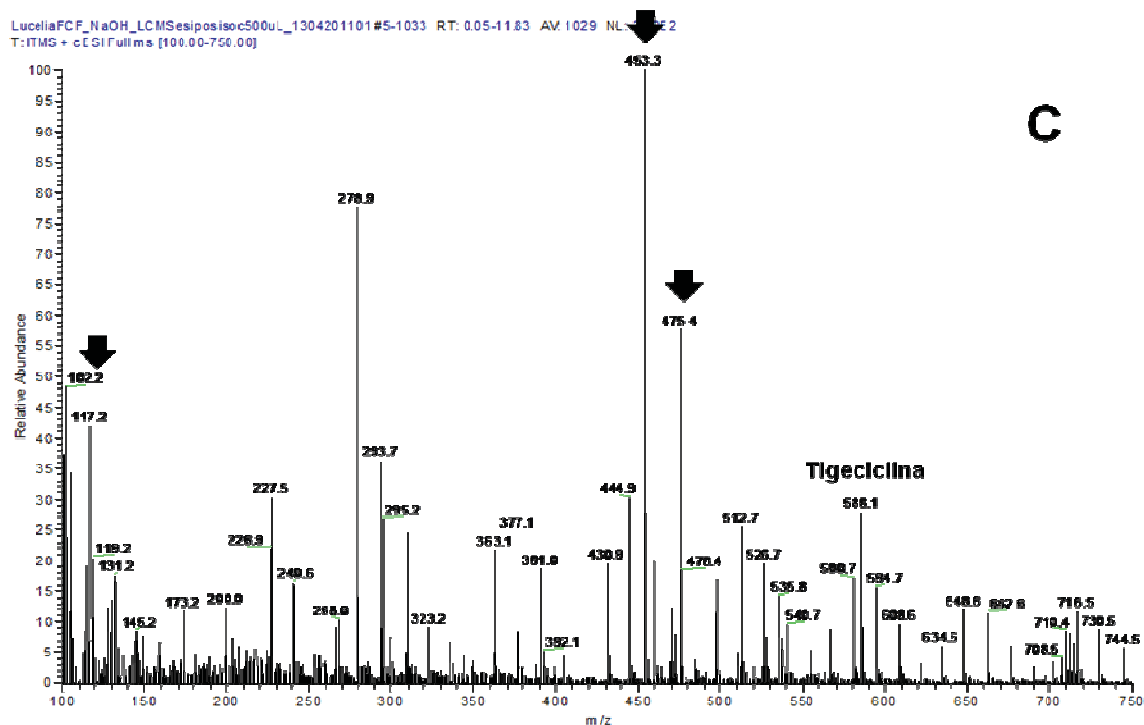


Figura 6.1.13 Espectro de massas da tigeciclina em pó liofilizado: (D) após degradação fotolítica

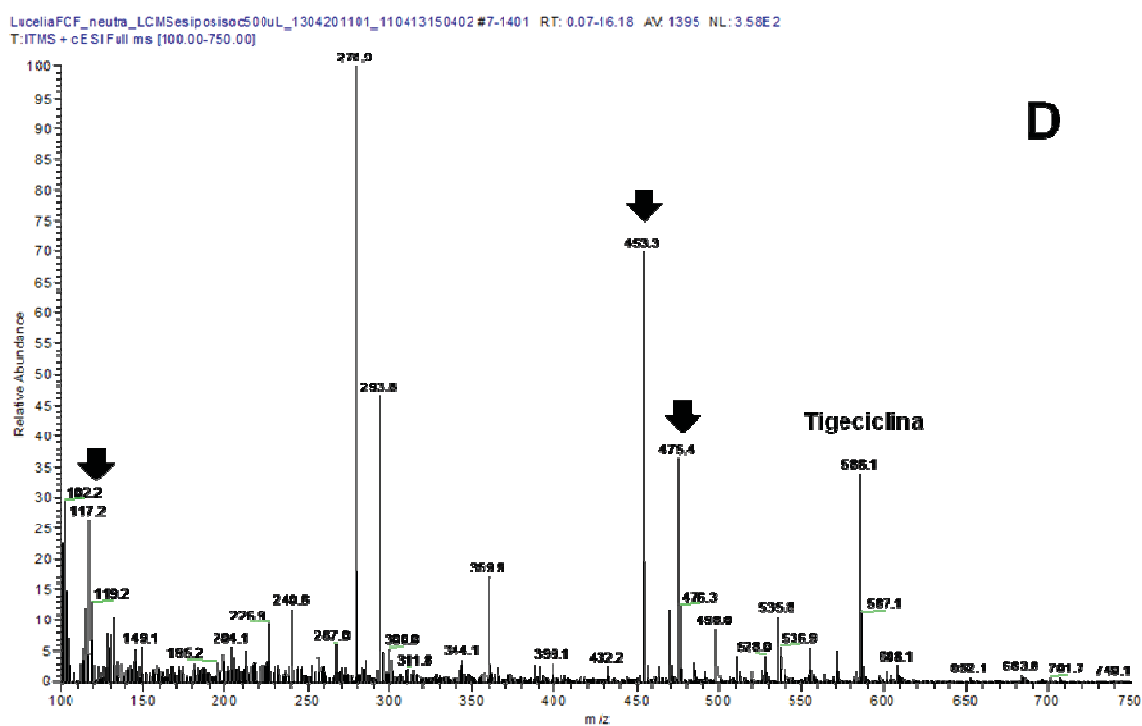


Figura 6.1.14 Espectro de massas da tigeciclina em pó liofilizado: (E) após oxidação

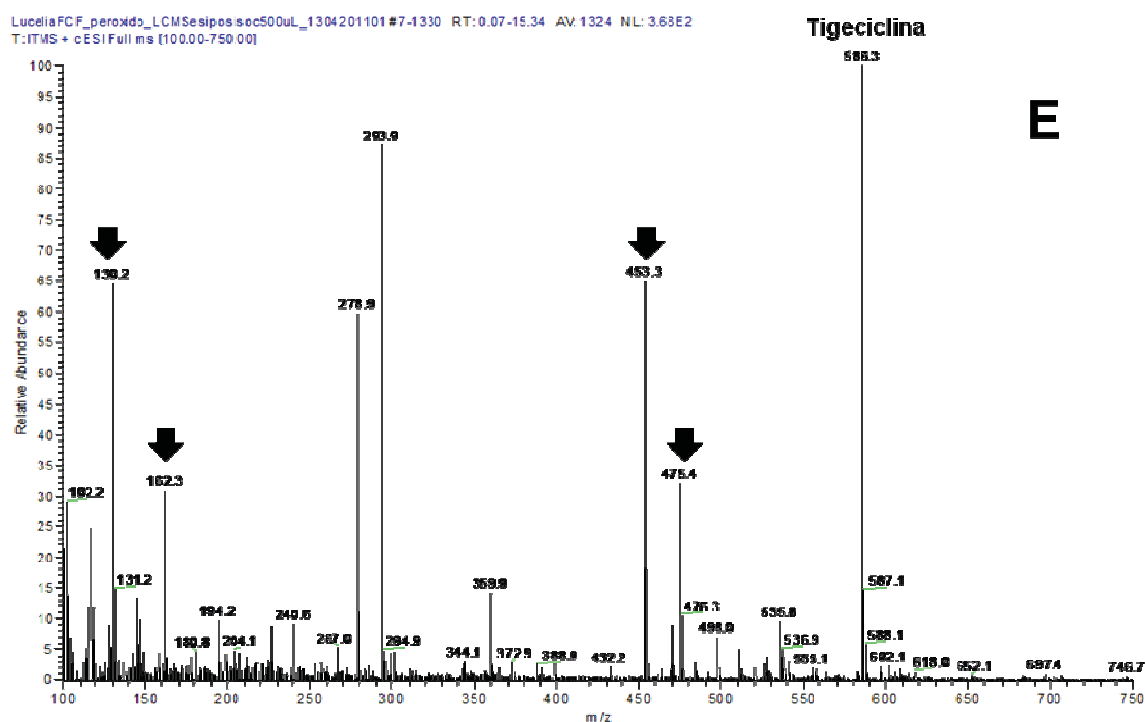
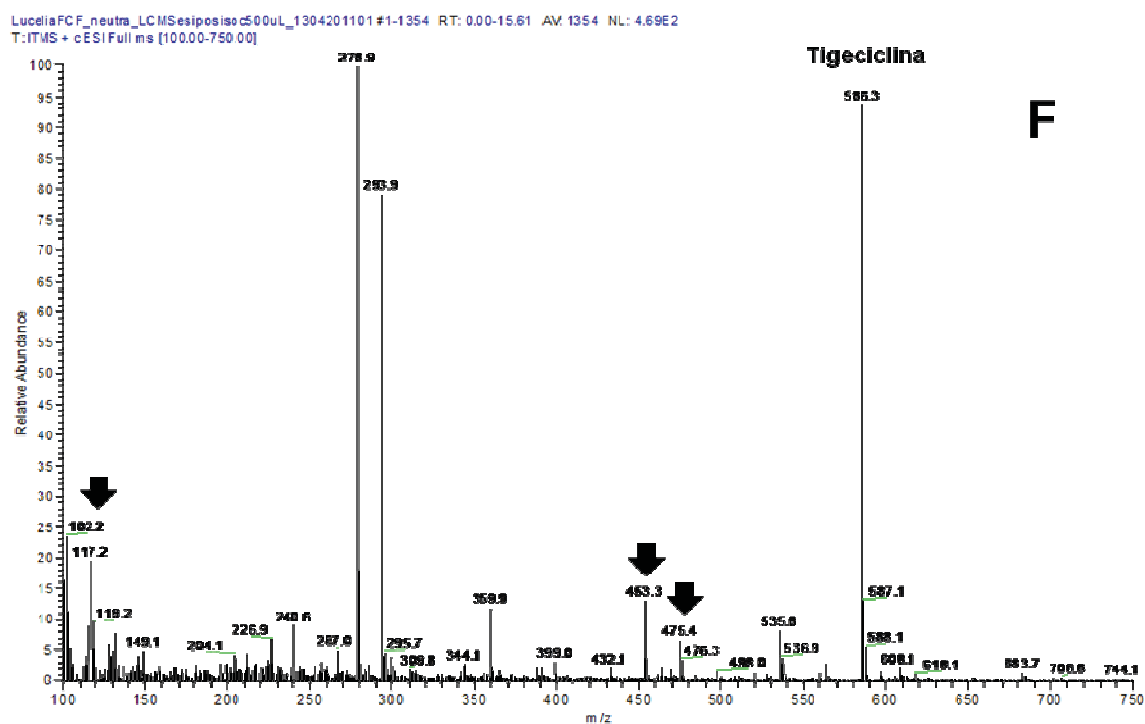


Figura 6.1.15 Espectro de massas da tigeciclina em pó liofilizado: (F) após degradação neutra



6.1.9 Discussão

A tigeciclina é um fármaco bastante sensível à oxidação, sendo necessário o preparo de soluções de fármaco diariamente e aplicação de nitrogênio, para expulsão do oxigênio, nos frascos contendo o fármaco em pó. Além disso, o valor elevado de aquisição do produto farmacêutico e a indisponibilidade de padrão de referência no Brasil, na época da realização do trabalho, determinaram a utilização de quantidades pequenas de padrão e amostras, o que pode ter contribuído para variabilidade nos ensaios.

Contornando as peculiaridades apresentadas pela tigeciclina, o método cromatográfico por fase reversa foi validado de acordo com parâmetros de validação preconizados em guias internacionais (ICH, 2005). A separação foi alcançada com tempo de corrida de 8,69 minutos (Figura 6.1.3).

As propriedades indicadoras de estabilidade do método são avaliadas por estudos de degradação forçada, particularmente quando não há informações disponíveis sobre potenciais produtos de degradação. Todas as condições avaliadas nos estudos de degradação forçada resultaram na formação de produtos de degradação. A condição oxidativa provocou decréscimo significativo e rápido da área do pico da tigeciclina, com seis picos adicionais bem visíveis e alguns outros pequenos detectados, confirmando a alta reatividade da tigeciclina com oxigênio, responsável pela baixa estabilidade deste fármaco. As condições neutra e básica provocaram decréscimo significativo da área do pico principal, com quatro e cinco picos adicionais detectados, respectivamente. A degradação em meio ácido foi mais lenta que nas condições neutra e básica com dois picos adicionais formados. Sobre condição fotolítica um decréscimo significativo da área foi observado com sete picos adicionais detectados. A geração de picos adicionais, relativos aos produtos de degradação, sob condições de hidrólises ácida, básica e neutra, fotolíticas e oxidativas e a análise de amostra preparada com excipiente, confirmaram a especificidade do método, uma vez que os picos da tigeciclina e dos produtos de degradação apresentaram-se bem resolvidos. Assim, a capacidade indicadora de estabilidade do método foi estabelecida através da resolução obtida entre o pico principal da tigeciclina e seus produtos de degradação. As soluções amostra de tigeciclina intacta e degradadas foram também analisadas por LC-MS. A tigeciclina sofreu ionização por *eletrospray* no modo positivo, entretanto alguns produtos de degradação não foram detectados, talvez devido a não ionização ou por possuírem massa inferior à faixa avaliada no estudo. O espectro de massas identificou três massas adicionais nas condições básica, ácida, neutra

e fotolítica, com valores de m/z 117,2; 453,3 e 475,4, respectivamente. Na condição oxidativa, quatro sinais adicionais foram observados, sendo dois diferentes dos sinais observados nas outras condições (m/z 130,2; 162,3; 453,3 e 475,4).

A análise por ANOVA dos dados utilizados na obtenção da curva analítica apresentou regressão linear significativa ($F_{\text{calculado}} (18342,48) > F_{\text{tabelado}} (4,6)$ e ausência de desvio de linearidade com $F_{\text{calculado}} (0,92) < F_{\text{tabelado}} (2,96)$. Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram DPR inferiores a 1,84%, o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza DPR menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003). Pode ser observado na Tabela 6.1.9, o valor médio experimental de 99,01%, confirmando exatidão significativa. Os valores calculados para o limite de detecção (LD) e para o limite de quantificação (LQ) de 1,67 e 5,05 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, indicam a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade tigeciclina em produtos comerciais. O LQ encontrado experimentalmente, com precisão ($\leq 5\%$), foi de 2,5 $\mu\text{g/mL}$. A robustez foi avaliada pelo teste de Youden no qual alterações dos parâmetros analíticos ocorrem simultaneamente (Tabela 6.1.3), não havendo nenhum efeito considerado significativo em comparação com o valor calculado utilizando a equação 6.1.7 (Tabela 6.1.10). Da mesma forma, os resultados da avaliação dos parâmetros de modo isolado confirmaram a robustez do método (Tabela 6.1.11). Por sua vez, os dados obtidos na verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico (Tabela 6.1.12) mostraram que o equipamento e as condições da metodologia são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura, a qual sugere que a assimetria do pico deve ser ≤ 2 , o fator de capacidade > 2 e número de pratos teóricos > 2000 . Em geral também é adotado como critério valor de $\text{DPR} \leq 2\%$ para todos os parâmetros testados (FDA, 1994; ICH, 2005; USP 33, 2010).

Demonstrou-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura oficial, podendo ser empregados para análise de tigeciclina em produtos farmacêuticos.

A tigeciclina não está descrita na literatura oficial, não havendo limites preconizados para seu teor em produtos farmacêuticos e padrão de referência oficial disponível. Assim, os altos teores obtidos para as amostras de pó liofilizado na validação do método analítico não são considerados irregulares, uma vez que os critérios de aceitação ainda serão estabelecidos. Entretanto, se adotarmos como base os limites preconizados para outras tetraciclinas, como exemplo a minociclina comprimidos, a qual possui limites de teor especificados de 92,5 – 107,5%, as amostras de tigeciclina pó liofilizado, analisadas neste trabalho, estariam reprovadas.

Conforme salientado, não há métodos cromatográficos validados publicados para avaliação de tigeciclina em pó liofilizado, o que é altamente aplicável no contexto da produção de produtos farmacêuticos. Sugere-se, portanto, que o método por CLAE, seja adotado unicamente ou em combinação com o ensaio microbiológico para a avaliação de potência e pureza de tigeciclina durante as etapas do processo de produção, controle da qualidade e avaliação da estabilidade do produto farmacêutico acabado.

6.2 ENSAIO MICROBIOLÓGICO – MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

6.2.1 Considerações gerais

O ensaio microbiológico de difusão em ágar é um método físico, no qual um micro-organismo é usado como revelador. O método emprega meio de cultura sólido inoculado, distribuído em placas, em sistema de bicamada, através do qual a substância teste se difunde. É essencial que se trabalhe com réplicas, de forma a compensar os desvios, inerentes ao ensaio ou acidentais (PINTO et al., 2010).

Estudos realizados com tigeciclina têm demonstrado que a utilização de meios de cultura de diferentes fabricantes e, conseqüentemente, com diferentes concentrações de manganês, interferem no tamanho do halo de inibição. Em meios onde a concentração de manganês é menor, os halos observados foram maiores. O mecanismo pelo qual o manganês interfere na atividade *in vitro* da tigeciclina é ainda desconhecido. Estudos complementares foram sugeridos para avaliar o efeito de diferentes concentrações de manganês e outros cátions divalentes (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+}) na atividade *in vitro* da tigeciclina, de modo a contribuir para o estabelecimento de condições adequadas para testes contra isolados clínicos (FERNÁNDEZ-MAZARRASA et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi realizar o desenvolvimento e validação de ensaio de quantificação de tigeciclina pó liofilizado em relação à SQR, utilizando método microbiológico de difusão em ágar, que relaciona o tamanho da zona de inibição com a concentração da substância aplicada. Baseando-se nos estudos acima citados, adicionou-se adequada concentração de EDTA, conhecido pela sua propriedade quelante, ao meio de cultura com objetivo de reduzir a interação entre possíveis cátions presentes e tigeciclina.

6.2.2 Ensaios preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos

Para quantificação de tigeciclina, foram realizados testes preliminares para padronizar as condições a serem utilizadas, verificando parâmetros como micro-organismo, meio de cultura, volume de meio de cultura nas camadas no interior da placa, concentrações do inóculo, fármaco e EDTA no meio de cultura, temperatura de incubação e solução diluente (Tabela 6.2.1).

Tabela 6.2.1. Parâmetros estudados para a avaliação de potência de tigeciclina em pó liofilizado pelo método de difusão em ágar

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 IAL 1606 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150 <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 IAL 2393 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372 IAL 1027
Meios de cultura	Camada base: Meio n° 1 de Grove Randall Camada base: Meio n° 11 de Grove Randall Camada semeada: Meio n° 11 de Grove Randall Camada semeada: Meio n° 1 de Grove Randall Camada semeada: Meio n° 2 de Grove Randall Camada semeada: Meio n° 3 de Grove Randall Camada semeada: Meio ágar BHI Camada semeada: Meio ágar Mueller Hinton
Volume das camadas base/semeada	21 e 4 mL; 20 e 5 mL
Concentração do inóculo	0,5; 1,0 e 2,0%
Temperatura de incubação	25 e 35 °C
Concentração de EDTA no meio de cultura	0,1; 0,05 e 0,008%
Solução diluente	Água purificada Tampão fosfato pH 6,0 Tampão fosfato pH 8,0 Tampão fosfato pH 10,0
Concentrações das soluções de amostra	0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 64 µg/mL 3; 6 e 12 µg/mL 80; 160 e 320 µg/mL 160; 320 e 640 µg/mL 100; 250 e 625 µg/mL 60; 240 e 960 µg/mL 16; 80 e 400 µg/mL

6.2.3 Execução do ensaio

A partir dos resultados obtidos com os diferentes micro-organismos e meios de cultura, estabeleceu-se os parâmetros para a realização do doseamento microbiológico (Tabela 6.2.2). A padronização do ensaio foi realizada utilizando-se técnica descrita para outros agentes antimicrobianos (F. BRAS., 2010).

Tabela 6.2.2. Parâmetros padronizados para avaliação de tigeciclina em produtos farmacêuticos por ensaio microbiológico – método difusão em ágar

<i>Parâmetros</i>	<i>Descrição</i>
Micro-organismo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372 IAL 1027
Concentração do inóculo	1,0%
Meios de cultura	Camada base: Meio n° 11 de Grove Randall Camada semeada: Meio n° 11 de Grove Randall
Solução diluente	Tampão fosfato pH 8,0
Concentração das soluções de amostra	3; 6 e 12 µg/mL
Temperatura de incubação	25 ± 2,0 °C
Tempo de incubação	18 horas

6.2.4 Material

Para o doseamento microbiológico, foi utilizado o meio de cultura ágar caseína-soja (Acumedia Manufacturers) para manutenção da cepa do micro-organismo, caldo caseína-soja (Acumedia Manufacturers) para preparo e padronização do inóculo, meio de cultura n° 11 de Grove Randall (BD- Becton, Dickinson and Company) nas camadas base e semeada. O meio de cultura, tampão e ponteiras foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Foram empregadas placas de Petri com 20,0 mm de altura x 100,0 mm de diâmetro, com papel de filtro nas tampas, para impedir que gotículas de condensação invalidem ou dificultem a leitura dos halos de inibição, e *templates* de aço inoxidável. Estes materiais e vidraria não volumétrica foram esterilizados em estufa a 180 °C por 1 hora. Utilizaram-se, na incubação, estufa

para cultura microbiológica ECB 1.2 digital Odontobrás (Ribeirão Preto, Brasil) e, para as leituras, paquímetro digital Starret (Itu, Brasil).

6.2.4.1 Preparo do meio de cultura

Os meios foram preparados conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em água sob aquecimento e esterilizados em autoclave (121 °C, 1 atm) durante 15 minutos. Antes da autoclavação, adicionou-se aos meios de cultura, EDTA na concentração de 0,008%.

6.2.4.2 Preparo do inóculo

O micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 9372 IAL 1027 foi repicado para caldo caseína-soja e mantido por 24 horas, para seu crescimento, em estufa microbiológica à temperatura de 35,0 °C $\pm$ 2,0 °C. Padronizou-se o inóculo a 580 nm em fotocolorímetro, obtendo-se transmitância de 25,0 $\pm$ 2,0%, diluído com o mesmo caldo. Após a padronização, o inóculo foi utilizado a 1,0% (v/v) em meio nº11 de Grove-Randall. O meio de cultura padronizado foi preparado e utilizado imediatamente (F. BRAS., 2010).

6.2.4.3 Preparo das soluções de tigeciclina SQR

Foram transferidos 2,5 mg de tigeciclina SQR, exatamente pesados, para balão volumétrico de 50 mL, para obtenção de solução com 50 µg/mL. Desta solução, retiraram-se 10 mL, que foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL, obtendo-se solução na concentração de 20 µg/mL. Após, tomaram-se alíquotas de 1,5; 3,0 e 6,0 mL e transferidas para balões volumétricos de 10 mL, obtendo as concentrações de 3; 6 e 12 µg/mL. Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato pH 8,0.

6.2.4.4 Preparo das soluções de tigeciclina na forma farmacêutica

O conteúdo de três frascos contendo 50 mg tigeciclina pó liofilizado foi adicionado a um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras, o equivalente a 2,5 mg foi transferido para

balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se solução de 50 µg/mL. Desta solução, 10 mL foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL, obtendo-se solução de 20 µg/mL. Alíquotas de 1,5; 3,0 e 6,0 mL da solução com concentração de 20 µg/mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, para obtenção de soluções com concentrações de 3; 6 e 12 µg/mL. Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato pH 8,0.

6.2.4.5 Preparo da solução placebo

A solução placebo foi preparada a partir do único excipiente presente nas amostras de pó liofilizado, lactose monoidratada. Foram transferidos 250 mg de lactose monoidratada para balão volumétrico de 500 mL, completando-se o volume com água purificada para obtenção de solução com concentração de 0,5 mg/mL.

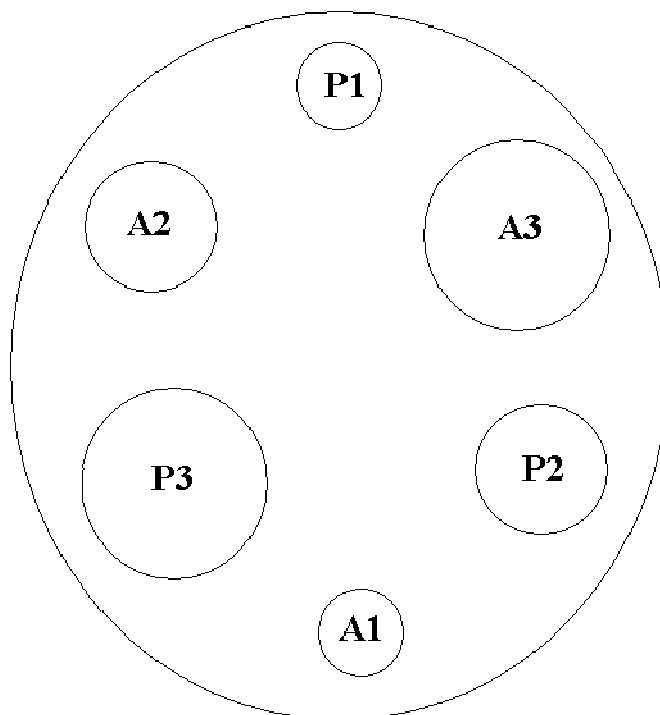
6.2.5 Ensaio

Foram utilizadas 7 placas de Petri para doseamento de tigeciclina pó liofilizado. Em capela de fluxo laminar, foram transferidos com auxílio de pipetador automático, 21,0 mL de meio nº11 de Grove-Randall para a camada base em cada placa. Após a solidificação desta camada, foram adicionados por meio de pipetador automático, 4,0 mL de meio nº 11 de Grove-Randall com inóculo a 1,0% (v/v). Após a solidificação da camada semeada, foi distribuído um *template* de aço inoxidável para cada placa. Aplicou-se, com auxílio de pipetador automático, 200,0 µL das soluções descritas nos itens 6.2.4.3. e 6.2.4.4 em cada um dos compartimentos. As placas foram incubadas a $25,0 \pm 2,0$ °C e após 18 horas, foram realizadas as medidas dos diâmetros dos halos de inibição com auxílio de paquímetro digital.

6.2.6 Obtenção da curva analítica

Para a construção da curva analítica foram utilizados três pontos como preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010) para delineamento 3 x 3 e a disposição das soluções substância de referência (P) e amostra (A) na placa de Petri são demonstradas pela Figura 6.2.1.

Figura 6.2.1. Delineamento 3 x 3, demonstrando a disposição das soluções substância de referência (P) e amostra (A) na placa de Petri, em que P1 (3 µg/mL); P2 (6 µg/mL); P3 (12 µg/mL) e A1 (3 µg/mL); A2 (6 µg/mL); A3 (12 µg/mL)



6.2.7 Cálculo da potência de tigeciclina em pó liofilizado

A potência do medicamento foi calculada pela equação de Hewitt (1977). A equação 6.2.1 utiliza as médias dos halos de inibição obtidos com as três doses de tigeciclina SQR e pó liofilizado, nas seis placas analisadas em cada ensaio.

$$\text{Potência (\%)} = \text{Antilog } M \times 100$$

$$M = F/b \quad b = E/I$$

Equação 6.2.1

em que:

$$F = 1/3 [(\bar{A}1 + \bar{A}2 + \bar{A}3) - (\bar{P}1 + \bar{P}2 + \bar{P}3)]$$

I = logaritmo da razão das doses

$$E = 1/4 [(\bar{A}3 + \bar{P}3) - (\bar{A}1 + \bar{P}1)]$$

6.2.8 Validação do método

6.2.8.1 Linearidade

A curva analítica final foi construída a partir da média de três curvas analisadas em três dias diferentes, cada uma composta por seis placas, conforme descrito no item 6.2.6. Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e do paralelismo foi constatada através da ANOVA.

6.2.8.2 Precisão

A precisão foi avaliada pela realização de ensaios de doseamento de tigeciclina pó liofilizado, durante quatro dias seguidos (item 6.2.7). Os coeficientes de variação dos dados foram calculados estatisticamente.

6.2.8.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação. O teste de recuperação foi realizado da mesma forma que para o doseamento das soluções do produto farmacêutico, com a diferença que neste caso a amostra analisada foi composta de placebo e quantidade conhecida de padrão adicionado, simulando a amostra de produto farmacêutico com potências de 80 (R1), 100 (R2) e 120 (R3)% em relação à tigeciclina SQR. Desta forma, foi possível avaliar a exatidão do método em determinar a potência de amostras com concentrações pré-definidas.

Neste ensaio, preparou-se uma solução de tigeciclina SQR, conforme item 6.2.4.3, com concentração de 50 µg/mL. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 10 mL para balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com solução tampão pH 8,0 e obtendo-se concentração final de 20 µg/mL. Aliquotas de 1,5; 3,0 e 6,0 mL foram retiradas e transferidas para balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se as soluções de 3, 6 e 12 µg/mL, correspondentes a P1, P2 e P3, respectivamente. Para preparo das soluções do ensaio de recuperação, volumes de 8 (R1), 10 (R2) e 12 (R3) mL foram retirados da solução SQR (50 µg/mL) e transferidos para balões volumétricos de 25 mL, completando-se os volumes com placebo (solução de lactose 0,5 mg/mL). A partir destas soluções as diluições seguintes não foram alteradas, retirando-se alíquotas de 1,5; 3,0 e 6,0 mL e transferindo-se para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume com tampão fosfato pH 8,0. Cada uma das amostras simuladas (R1, R2 e R3) foi doseada em ensaios independentes.

Desta forma, obteve-se as seguintes concentrações pré-definidas:

Para o teste de recuperação 1: 2,4; 4,8 e 9,6 µg/mL, representando amostra de 80% de potência.

Para o teste de recuperação 2: 3; 6 e 12 µg/mL, representando amostra de 100% de potência.

Para o teste de recuperação 3: 3,6; 7,2 e 14,4 µg/mL, representando amostra de 120% de potência.

6.2.8.3.1 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada pela equação 6.2.2.

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{PR/PT}) \cdot 100$$

Equação 6.2.2

em que:

PR = potência encontrada nas amostras de recuperação

PT = Potência teórica

6.2.8.4 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada através de modificações nas condições estabelecidas, tais como: tempo de incubação (18 e 24 horas), temperatura de incubação (25 e 30 °C), concentração do inóculo (1,0 e 1,2%) e volume da camada semeada (4 e 5 mL). Realizou-se a análise de potência das amostras de tigeciclina em condições normais e alteradas paralelamente, avaliando-se a interferência das modificações no resultado final.

6.2.9 Resultados

Os métodos oficiais descritos para tetraciclina utilizam a turbidimetria devido à dificuldade de difusibilidade apresentada por estes fármacos. A tigeciclina, assim como as tetraciclina, também apresenta esta dificuldade e isto pode ser atribuído à grande reatividade destes compostos. Alguns constituintes dos meios de cultura, como metais, podem reagir e interferir na difusão da tigeciclina, dificultando a seleção de doses que estejam em progressão geométrica e que apresentem respostas lineares, simultaneamente (FERNÁNDEZ-MAZARRASA et al., 2009). Após vários testes, observou-se que concentrações menores de tigeciclina apresentaram melhor linearidade, porém os halos gerados foram muito pequenos. A alternativa encontrada foi utilizar um agente quelante para reduzir a reatividade entre o meio de cultura e o fármaco. O agente selecionado foi o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), por possuir conhecida atividade e ser bastante utilizado na área farmacêutica. Além disso, reduziu-se a temperatura de incubação das placas, aumentando assim o tamanho dos halos e possibilitando a validação do método.

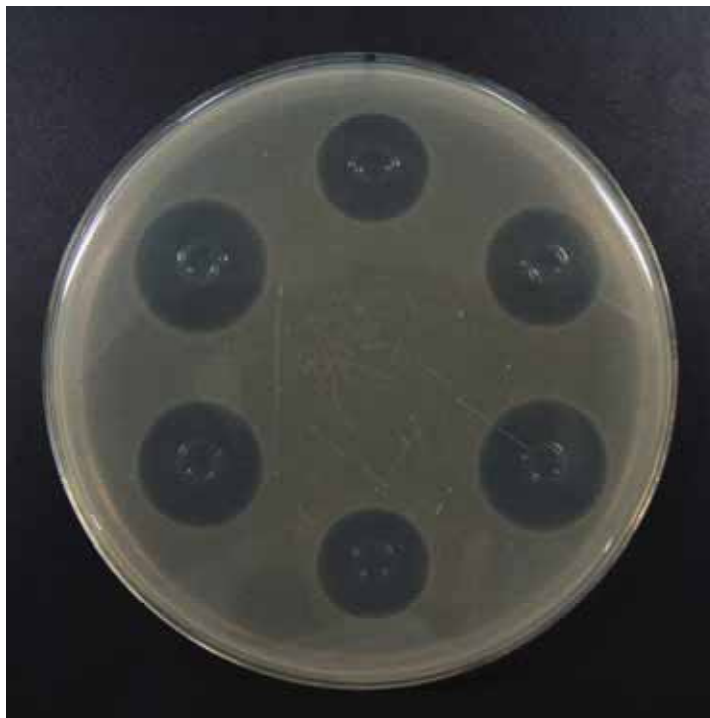
A utilização das cepas de *S. epidermidis*, *E. coli* e *E. faecalis* não apresentou condições de utilização por apresentar crescimento menos intenso, halos mal delimitados e medidas irregulares nas faixas de concentração e diluentes testados. A cepa de *S. aureus* apresentou crescimento satisfatório, porém os halos de inibição foram muito pequenos. Assim, a cepa que ofereceu melhores resultados foi a de *Bacillus subtilis* ATCC 9372 IAL 1027, fornecendo halos maiores e regulares, bem delimitados e com boa repetitibilidade, justificando a sua escolha para o método.

O tamanho dos halos de inibição não foi afetado diretamente pela composição do meio. Foi selecionado o meio nº 11 de Grove-Randall para as camadas base e de superfície. A concentração do inóculo empregada deve ser suficiente para apresentar crescimento homogêneo

do micro-organismo, propiciando um contraste com a zona de inibição de crescimento, sem apresentar colônias isoladas. Os melhores resultados e o crescimento mais uniforme foram obtidos com o inóculo com concentração de 1,0%, sendo a concentração de 0,5% insuficiente, considerando que a temperatura de incubação foi 25 ± 2 °C. Em soluções diluentes em diferentes pH, observou-se que em pH 8,0 os halos de inibição formados foram maiores e mais uniformes, sendo este pH compatível com o crescimento bacteriano e com a atividade do fármaco. As concentrações do fármaco utilizadas na curva de dosagem devem estar em progressão geométrica, havendo relação linear entre o logaritmo da concentração e o diâmetro dos halos de inibição de crescimento. As concentrações de 3, 6 e 12 µg/mL apresentaram excelentes resultados, avaliados através de análise estatística. Em relação à incubação, deve haver uma combinação entre tempo e temperatura para que o crescimento do micro-organismo seja uniforme e os halos formados de tamanho adequado. Os melhores resultados foram obtidos com 18 horas de incubação com temperatura de 25 ± 2 °C.

A Figura 6.2.2 mostra a fotografia da placa de Petri com os halos de inibição obtidos com as diferentes doses de tigeciclina SQR e pó liofilizado.

Figura 6.2.2. Placa de Petri com os halos de inibição de crescimento do micro-organismo *B. subtilis* ATCC 9372 IAL 1027, obtidos com as doses 3,0; 6,0 e 12,0 µg/mL de tigeciclina SQR e pó liofilizado



6.2.9.1 Linearidade

Os valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano, obtidos durante avaliação da linearidade do método, para as soluções em diferentes concentrações de tigeciclina SQR e pó liofilizado encontram-se na Tabela 6.2.3.

Tabela 6.2.3. Diâmetros dos halos de inibição obtidos no ensaio microbiológico para avaliação de tigeciclina em produtos farmacêuticos– método difusão em ágar

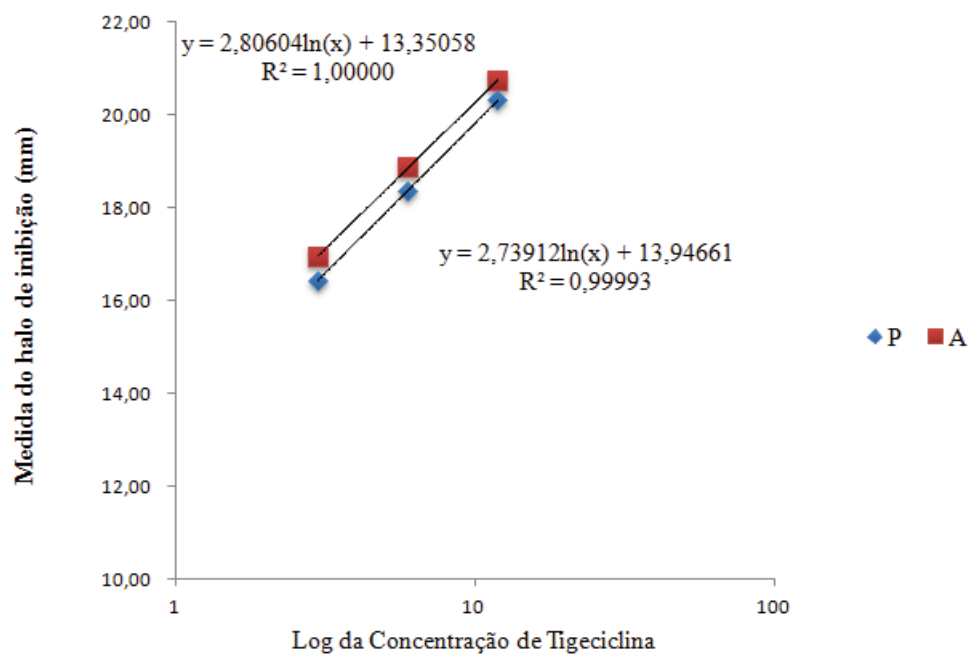
	Diâmetro dos halos de inibição (mm) ^a					
	P1	P2	P3	A1	A2	A3
	(3 µg/mL)	(6 µg/mL)	(12 µg/mL)	(3 µg/mL)	(6 µg/mL)	(12 µg/mL)
	16,63	18,48	20,25	17,04	18,96	20,71
	16,33	18,19	20,20	16,80	18,75	20,67
	16,25	18,47	20,52	17,00	18,92	20,86
Diâmetro médio	16,39	18,38	20,32	16,95	18,87	20,74
DPR (%)^b	1,22	0,89	0,84	0,78	0,60	0,50

^a média de seis determinações

^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

As curvas analíticas de tigeciclina SQR e amostra (Figura 6.2.3) foram construídas com as médias dos valores das absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo. As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, são: $y = 2,80604 \ln(x) + 13,35058$, com coeficiente de determinação (r^2) igual a 1,00000, para a tigeciclina SQR e $y = 2,73912 \ln(x) + 13,94661$, com r^2 de 0,99993, para o fármaco em pó liofilizado.

Figura 6.2.3. Curvas analíticas de soluções de tigeciclina SQR e amostra, em concentrações de 3,0; 6,0 e 12,0 µg/mL, obtidas pelo método microbiológico de difusão em ágar



A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de tigeciclina é mostrada na Tabela 6.2.4.

Tabela 6.2.4. Análise de variância das medidas dos halos de inibição determinados na obtenção das curvas analíticas de tigeciclina, utilizando o método de difusão em ágar.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Preparação	1	1,02	1,02	67,20*	4,96
Regressão	1	44,32	44,32	2919,69*	4,96
Desvio de Paralelismo	1	0,01	0,01	0,43	4,96
Quadrático	1	0,00	0,00	0,06	4,96
Diferença de Quadrático	1	0,00	0,00	0,04	4,96
Entre doses	5	45,35	9,07	597,48*	3,33
Entre placas	2	0,11	0,06	3,72	4,10
Dentro (erro)	10	0,15	0,02		
Total	17	45,61			

* Significativo para $p < 0,05$

6.2.9.2 Precisão

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base nos coeficientes de variação para cada dose. Seis placas com três doses de tigeciclina SQR e amostra foram analisadas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram coeficientes de variação inferiores a 1,40%. Para a determinação da precisão interdias realizaram-se análises de uma amostra, em quatro dias consecutivos, obtendo-se valor experimental médio de potência de 118,95%, com DPR de 0,37%. Os resultados obtidos na avaliação da precisão interdias são mostrados na Tabela 6.2.5.

Tabela 6.2.5. Valores determinados de potência de tigeciclina em pó liofilizado na avaliação da precisão do método de difusão em ágar

Dia	Tigeciclina em pó liofilizado ^a		Potência média (%)	DPR ^b (%)
	mg/frasco	%		
1	62,93	118,73	118,95	0,37
2	63,29	119,42		
3	63,18	119,20		
4	62,78	118,45		

^a média de seis determinações

^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

6.2.9.3 Exatidão

Determinou-se a exatidão do método através do teste de recuperação. Utilizando a equação 6.2.2, obteve-se valor médio de exatidão de 98,69%. Os resultados do teste de recuperação estão representados na Tabela 6.2.6.

Tabela 6.2.6. Teste de recuperação do método de difusão em ágar

	Potência teórica (%)	Potência encontrada ^a (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR ^b (%)
Recuperação 1	80	77,67	97,09		
Recuperação 2	100	99,03	99,03	98,69	1,47
Recuperação 3	120	119,93	99,94		

^a média de seis determinações.

^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual.

6.2.9.4 Robustez

A robustez foi avaliada através de alterações no tempo e temperatura de incubação, volume da camada semeada e concentração de inóculo. Na execução de análises do produto farmacêutico sob parâmetros alterados, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os coeficientes de variação foram inferiores a 1,88%, comprovando a robustez do método proposto, frente aos parâmetros avaliados, conforme demonstra a Tabela 6.2.7.

Tabela 6.2.7. Parâmetros determinados na avaliação da robustez do método microbiológico para análise de tigeciclina por difusão em ágar

Variável	Faixa investigada	Tigeciclina ^a (mg /frasco)	Tigeciclina ^a (%)	DPR ^b (%)
Tempo de incubação (horas)	18	63,10	119,06	1,08
	24	62,15	117,26	
Temperatura de incubação (°C)	25	62,31	117,56	0,19
	30	62,47	117,87	
Volume da camada semeada (mL)	4	60,63	114,39	1,88
	5	62,26	117,47	
Concentração do inóculo (%)	1,0	65,12	122,87	0,21
	1,2	64,93	122,50	

^a média de seis determinações

^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

6.2.10 Discussão

O ensaio microbiológico de antimicrobianos consiste na determinação da potência ou atividade biológica destes agentes; a quantificação de antimicrobianos por métodos químicos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria mostram-se precisos, porém

não fornecem verdadeira indicação sobre a atividade biológica (ADAMS et al., 1998; LOPES e SALGADO, 2010).

Na validação do método microbiológico de difusão em ágar, a análise estatística demonstrou que não existe desvio da linearidade nas curvas analíticas originadas da substância química de referência e amostra. Os coeficientes de determinação de 1,0 e 0,99993, para a substância química de referência e pó liofilizado, respectivamente, foram satisfatórios para um ensaio biológico que possui conhecida variabilidade inerente. A precisão do método foi determinada através da avaliação de potência de tigeciclina pó liofilizado, durante quatro dias consecutivos. O Desvio Padrão Relativo entre os teores foi 0,37%, sendo o teor médio de tigeciclina no pó liofilizado, calculado através da equação de Hewitt (1977), de 118,95%. O teste de recuperação foi efetuado com o objetivo de comprovar a exatidão do método proposto. Desta forma, quantidades conhecidas da substância de referência foram adicionadas ao placebo para quantificação da substância. A recuperação média foi de 98,69%, comprovando a exatidão do método proposto.

Os parâmetros estudados para a validação do método microbiológico de difusão em ágar atenderam os conceitos sobre validação, apresentados na Farmacopeia Brasileira (2010), comprovando a aplicabilidade do método para quantificação de tigeciclina na forma farmacêutica pó liofilizado.

6.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO – MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

6.3.1 Considerações gerais

Ensaio por difusão em ágar, embora adequados e muito utilizados, frequentemente não oferecem resultados rápidos e exatos para grande número de amostras. A necessidade crescente de desenvolvimento e controle de fármacos em diferentes matrizes faz com que o número dessas amostras sejam cada vez maiores. Precisão excelente pode ser alcançada com ensaio microbiológico turbidimétrico, o qual tem sido usado para avaliação de potência de antimicrobianos, resultando em aumento expressivo da velocidade de realização do ensaio (PITKIN et al., 1974).

O método turbidimétrico baseia-se na inibição do crescimento microbiano medido através da turbidez (absorvância) da suspensão de micro-organismos adequados/sensíveis ao agente antimicrobiano, ambos contidos em meio de cultura líquido. A resposta do micro-organismo é função direta da concentração da substância ativa.

Estudos realizados com tigeciclina demonstraram que para ensaios microbiológicos este antimicrobiano deve ser incorporado no meio de cultura no dia do uso ou, quando realizado em meio líquido, este deve ser recém preparado ou degaseificado a fim de reduzir a quantidade de oxigênio no meio. Uma alternativa ao uso de meio recém preparado é adição de enzima oxirase ao meio de cultura, a qual também diminui a concentração de oxigênio presente (HOPE et al., 2005). Observou-se que a atividade de tigeciclina contra população diversa de bactérias foi maior em meios frescos quando comparado meios de cultura com diferentes tempos de preparo (PETERSEN e BRADFORD, 2005).

Neste contexto, foi desenvolvido e validado método microbiológico turbidimétrico para avaliação de potência de tigeciclina pó liofilizado, utilizando método simples e rápido, com meio de cultura recém preparado.

6.3.2 Ensaios preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos

Diversos testes preliminares foram realizados para padronização das condições a serem utilizadas no método, verificando parâmetros como micro-organismo, meio de cultura, tempo e

temperatura de incubação, tempo de preparo do meio de cultura, solução diluente, concentrações do inóculo e do fármaco (Tabela 6.3.1).

Tabela 6.3.1. Parâmetros estudados para a avaliação de potência de tigeciclina em pó liofilizado pelo método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 IAL 1606 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150 <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 IAL 2393 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372 IAL 1027 <i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341 e IAL 636
Meios de cultura	caldo BHI caldo caseína-soja
Tempo de incubação	3 e 4 horas
Temperatura de incubação	25 e 35 °C
Concentração do inóculo	0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 8,0; 10,0; 15,0 e 20,0%
Tempo após preparo do meio de cultura	1, 12 e 24 horas
Solução diluente	Água purificada tampão fosfato pH 6,0 tampão fosfato pH 8,0
Concentrações das soluções de amostra	0,005; 0,01; 0,03; 0,06; 0,08; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 1,60; 2,00; 2,40; 2,50; 3,00; 3,60; 4,00; 4,32; 4,50; 6,00; 6,75; 8,00; 9,00; 12,00 e 16,00 µg/mL

6.3.3 Execução do ensaio

A partir dos resultados obtidos com as diferentes condições do método, estabeleceram-se os parâmetros para a realização do doseamento microbiológico (Tabela 6.3.2).

Tabela 6.3.2. Parâmetros padronizados para avaliação de tigeciclina em pó liofilizado por ensaio microbiológico – método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 IAL 1606
Meio de cultura	caldo caseína-soja
Tempo de incubação	3 horas
Temperatura de incubação	35 °C
Concentração do inoculo	8,0%
Tempo após preparo do meio de cultura	1 hora
Solução diluente	Água purificada
Concentrações das soluções de amostra	3,0; 3,6 e 4,32 µg/mL

6.3.4 Material

Para o doseamento microbiológico, foi utilizado o meio de cultura ágar caseína-soja (Acumedia Manufacturers) para manutenção da cepa do micro-organismo, caldo caseína-soja (Acumedia Manufacturers) para preparo e padronização do inóculo e realização do ensaio. O meio de cultura, diluente e ponteiras foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Foram empregados tubos de ensaio com 25,0 mm de diâmetro x 150,0 mm de altura devidamente tampados com algodão. Para a incubação utilizaram-se incubador Shaker Marconi® modelo MA420 e estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital Odontobrás (Ribeirão Preto, Brasil) e, para as leituras, utilizou-se fotocolorímetro Quimis, modelo Q-798DRM.

6.3.4.1 Preparo do meio de cultura

O meio foi preparado conforme indicado em seu respectivo rótulo, sendo dissolvido em água sob aquecimento, distribuídos nos tubos de ensaio (10 mL/tubo) e esterilizado em autoclave (condições: 121 °C, 1 atm) durante 15 minutos. Após autoclavação, os tubos contendo caldo foram resfriados e utilizados imediatamente.

6.3.4.2 Preparo do inóculo

O micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 IAL 1606 foi repicado para caldo caseína-soja e incubado, por 23 horas, em estufa microbiológica à temperatura de 35,0 °C ± 2,0 °C. O inóculo foi padronizado com transmitância de 25,0 ± 2,0% em fotocolorímetro a 580 nm.

6.3.4.3 Preparo das soluções de tigeciclina SQR

Foi transferido o equivalente a 3,125 mg de tigeciclina SQR, exatamente pesado, para balão volumétrico de 25 mL para obtenção de solução com 125 µg/mL. Desta solução, 5 mL foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL, obtendo-se solução na concentração de 25 µg/mL. Após, alíquotas de 3,0; 3,6 e 4,32 mL foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, obtendo as concentrações de 3,0; 3,6 e 4,32 µg/mL. Todas as soluções foram preparadas em água purificada.

6.3.4.4 Preparo das soluções de tigeciclina na forma farmacêutica

O conteúdo de três frascos contendo 50 mg tigeciclina pó liofilizado foi adicionado a um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras pesou-se o equivalente a 6,25 mg e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se solução de 125 µg/mL. Desta solução, 5 mL foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL, obtendo-se solução de 25 µg/mL. Alíquotas de 3,0; 3,6 e 4,32 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, gerando soluções com concentrações de 3,0; 3,6 e 4,32 µg/mL. Todas as soluções foram preparadas em água purificada.

6.3.5 Ensaio

Iniciou-se o ensaio após autoclavação dos tubos contendo caldo caseína soja, padronização do inóculo e preparo das soluções com diferentes concentrações do padrão e amostra. Adicionaram-se em cada tubo 200 µL de solução de padrão ou amostra, após, 800 µL do inóculo padronizado. Foram utilizados 20 tubos para o ensaio por retas paralelas 3 x 3, sendo três tubos para cada concentração do padrão e da amostra, um para controle positivo (contendo somente caldo e o inóculo) e um para controle negativo (contendo somente o caldo). Incubou-se, em banho de aquecimento com agitador orbital, à temperatura de $35,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 3 horas. Após o período de incubação, interrompeu-se o crescimento microbiano com adição de 500 µL de solução de formaldeído 12% em todos os tubos. Determinou-se a absorvância para cada tubo em fotolorímetro a 530 nm. O aparelho foi zerado com o tubo contendo 10,0 mL de caldo e 500 µL de formaldeído 12% (controle negativo).

6.3.6 Obtenção da curva analítica

A curva analítica foi obtida conforme descrito no item 6.3.5. Analisou-se uma curva em cada dia, durante três dias consecutivos. Cada ponto de cada curva foi preparado em triplicata.

6.3.7 Cálculo da potência de tigeciclina em pó liofilizado

A potência do medicamento foi calculada pela equação de Hewitt (1977). A equação utiliza as médias das leituras de absorvância dos tubos obtidas com as três doses de tigeciclina SQR e pó liofilizado, nos 18 tubos analisados em cada ensaio. A equação foi descrita no item 6.2.7.

6.3.8 Validação do método

6.3.8.1 Linearidade

A curva analítica final foi construída a partir da média de três curvas analisadas em três dias diferentes, cada uma composta por 18 tubos, conforme descrito no item 6.3.6. Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo

método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada através da ANOVA.

6.3.8.2 Precisão

A precisão foi avaliada pela realização de ensaios de doseamento de tigeciclina pó liofilizado, durante três dias seguidos (item 6.3.7). Os coeficientes de variação dos dados foram calculados estatisticamente.

6.3.8.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação. As amostras foram preparadas conforme item 6.2.8.3. Neste ensaio, preparou-se uma solução de tigeciclina SQR, conforme item 6.3.4.3, com concentração de 125 µg/mL. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 5 mL para balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com água e obtendo-se concentração final de 25 µg/mL. Aliquotas de 3,0; 3,6 e 4,32 mL foram retiradas e transferidas para balões volumétricos de 25 mL, obtendo-se as soluções de 3,0; 3,6 e 4,32 µg/mL, correspondentes a P1, P2 e P3, respectivamente. Para preparo das soluções para avaliação das recuperações, volumes de 4 mL (R1), 5 mL (R2) e 6mL (R3) da solução SQR (125 µg/mL) foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL, completando-se os volumes com placebo (solução de lactose 0,5 mg/mL). A partir destas soluções as diluições seguintes não foram alteradas, retirando-se alíquotas de 3,0; 3,6 e 4,32 mL e tranferindo-se para balões volumétricos de 25 mL, completando-se o volume com água purificada. Cada uma das amostras simuladas (R1, R2 e R3) foram doseadas em ensaios independentes.

Desta forma, obtivemos as seguintes concentrações pré-definidas:

Para o teste de recuperação 1: 2,4; 2,88 e 3,46 µg/mL, representando amostra de 80% de potência.

Para o teste de recuperação 2: 3,0; 3,6 e 4,32 µg/mL, representando amostra de 100% de potência.

Para o teste de recuperação 3: 3,6; 4,32 e 5,18 µg/mL, representando amostra de 120% de potência.

6.3.8.3.1 Cálculo do teste de recuperação

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada pela equação 6.2.2.

6.3.8.4 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada através de modificações nas condições estabelecidas, tais como: tempo de incubação (2h45min; 3h; 3h15min), comprimento de onda de leitura dos tubos (525, 530, 535 nm) e concentração do inóculo (7,8; 8; 8,2%). Realizou-se a análise de potência das amostras de tigeciclina em condições normais e alteradas paralelamente, avaliando a interferência das modificações no resultado final.

6.3.9 Resultados

No desenvolvimento do método turbidimétrico para a determinação de tigeciclina em pó liofilizado algumas dificuldades foram encontradas até o estabelecimento das condições apropriadas. Diferentes doses de tigeciclina foram testadas a fim de se encontrar a faixa linear do método. Entretanto, observou-se que outros fatores como os tempos de preparo do meio de cultura, de incubação do inóculo antes da padronização e de incubação dos tubos interferem na linearidade e principalmente, precisão do método. A cada fator limitante determinado, novos testes com novas concentrações de tigeciclina foram realizados. Conforme observado, a região linear do método foi estreita, necessitando a utilização de razão 1,2 entre as concentrações utilizadas. Finalmente, foram escolhidas as concentrações 3,0; 3,6 e 4,32 µg/mL, as quais encontram-se dentro da faixa linear do método, permitindo doseamento de amostras com teores maiores e menores que 100% com adequado paralelismo em relação à reta do padrão.

A utilização do micro-organismo *S. aureus* baseia-se na sua sensibilidade frente à tigeciclina e pela facilidade de crescimento, permitindo a realização do ensaio com 3 horas de incubação, tempo esse que estendeu a região linear do método em relação ao tempo de 4 horas.

Observou-se também que, quando os tubos foram preparados e esterilizados no dia anterior ao ensaio, os resultados apresentavam maior variação, impossibilitando a determinação das condições do método. Além disso, o estágio de crescimento do micro-organismo antes de sua

padronização, também se mostrou um fator limitante, devendo o tempo de incubação, antes do ensaio, ser exatamente controlado.

6.3.9.1 Linearidade

Os valores das absorvâncias dos tubos, obtidos durante avaliação da linearidade do método, para as soluções em diferentes concentrações de tigeciclina SQR e pó liofilizado encontram-se na Tabela 6.3.3.

Tabela 6.3.3. Leitura das absorvâncias obtidas na avaliação de linearidade do ensaio microbiológico para avaliação de tigeciclina em pó liofilizado– método turbidimétrico

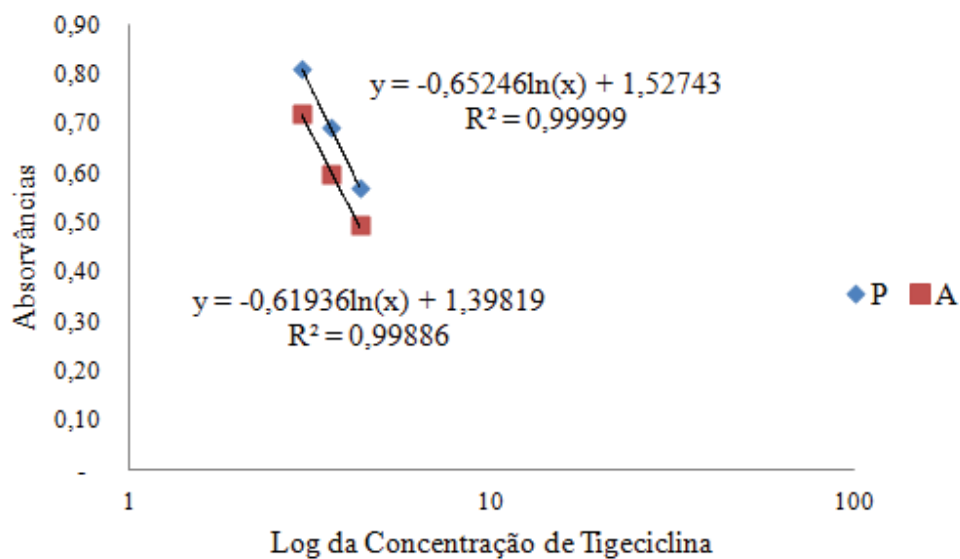
	Absorvâncias ^a					
	P1 (3 µg/mL)	P2 (3,6 µg/mL)	P3 (4,32 µg/mL)	A1 (3 µg/mL)	A2 (3,6 µg/mL)	A3 (4,32 µg/mL)
	0,809	0,687	0,560	0,715	0,595	0,491
	0,805	0,702	0,579	0,699	0,598	0,494
	0,817	0,687	0,579	0,746	0,609	0,497
Absorvância média	0,810	0,692	0,573	0,720	0,600	0,494
DPR (%)^b	0,78	1,25	1,90	3,35	1,22	0,64

^a média de três determinações

^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

As curvas analíticas de tigeciclina SQR e amostra (Figura 6.3.1) foram construídas com as médias dos valores das absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo. As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, são: $y = -0,65246 \ln(x) + 1,52743$, com um coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9999, para a tigeciclina SQR e $y = -0,61936 \ln(x) + 1,39819$, com r^2 de 0,99886, para o fármaco em pó liofilizado.

Figura 6.3.1. Curvas analíticas de soluções de tigeciclina SQR e pó liofilizado, em concentrações de 3,0; 3,6 e 4,32 µg/mL, obtidas pelo método microbiológico turbidimétrico



A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de tigeciclina é mostrada na Tabela 6.3.4.

Tabela 6.3.4. Análise de variância das absorvâncias determinadas na obtenção das curvas analíticas de tigeciclina, utilizando o método turbidimétrico

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Preparação	1	0,03393	0,03393	281,379*	4,96
Regressão	1	0,16131	0,16131	1337,52*	4,96
Desvio de Paralelismo	1	0,00011	0,00011	0,91	4,96
Quadrático	1	0,00004	0,00004	0,31	4,96
Diferença de Quadrático	1	0,00005	0,00005	0,42	4,96
Entre doses	5	0,1954	0,0391	324,11*	3,33
Entre tubos	2	0,0005	0,0003	2,28	4,10
Dentro (erro)	10	0,0012	0,0001		
Total	17	0,1972			

* Significativo para $p < 0,05$

6.3.9.2 Precisão

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base no Desvio Padrão Relativo de seis tubos com a dose intermediária de tigeciclina SQR. Os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram Desvio Padrão Relativo de 1,80%. Para a determinação da precisão interdias realizaram-se análises de uma amostra, em quatro dias consecutivos, obtendo-se valor experimental médio de potência de 115,78%, com DPR de 0,37%. Os resultados obtidos na avaliação da precisão interdias são mostrados na Tabela 6.3.5.

Tabela 6.3.5. Valores determinados de potência de tigeciclina em pó liofilizado na avaliação da precisão do método turbidimétrico

Dia	Tigeciclina em pó liofilizado ^a		Potência média (%)	DPR ^b (%)
	mg/frasco	%		
1	61,31	115,67	115,78	0,37
2	61,55	116,13		
3	61,54	116,11		
4	61,07	115,22		

^a média de três determinações

^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

6.3.9.3 Exatidão

Determinou-se a exatidão do método através do teste de recuperação. Utilizando a equação 6.2.2, obteve-se valor médio de exatidão de 99,74%. Os resultados do teste de recuperação estão representados na Tabela 6.3.6.

Tabela 6.3.6. Teste de recuperação do método turbidimétrico para tigeciclina

	Potência teórica (%)	Potência encontrada ^a (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR ^b (%)
Recuperação 1	80	78,92	98,65		
Recuperação 2	100	100,18	100,18	99,74	0,95
Recuperação 3	120	120,45	100,38		

^a média de três determinações

^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

6.3.9.4 Robustez

A robustez foi avaliada através de alterações no tempo de incubação, comprimento de onda de leitura dos tubos e concentração do inóculo. As alterações realizadas não provocaram mudanças nos resultados de teores das amostras de pó liofilizado doseadas pelo método. Os coeficientes de variação entre os teores foram inferiores a 1,55%, comprovando a robustez do método proposto para os parâmetros avaliados, conforme demonstra a Tabela 6.3.7.

Tabela 6.3.7. Parâmetros da avaliação da robustez do método microbiológico turbidimétrico para análise de tigeciclina em pó liofilizado

Variável	Faixa investigada	Tigeciclina ^a (mg /frasco)	Tigeciclina ^a (%)	DPR ^b (%)
Tempo de incubação (°C)	2h 45min	59,11	111,53	0,60
	3h	58,46	110,30	
	3h 15min	59,02	111,35	
Comprimento de onda (nm)	525	58,79	110,93	0,31
	530	58,46	110,30	
	535	58,50	110,37	
Concentração do inóculo (%)	7,8	59,32	111,92	1,55
	8,0	57,96	109,35	
	8,2	59,69	112,63	

^a média de três determinações

^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

6.3.10 Discussão

Os ensaios microbiológicos possuem desvantagens relacionadas ao tempo de execução e volume de trabalho e material empregado. Em função disso, esses métodos têm sido substituídos por ensaios físico-químicos, os quais são mais rápidos e práticos. Entretanto, a substituição de

ensaios microbiológicos pode gerar sérias consequências relativas à segurança e eficácia do antimicrobiano, pois muitas vezes a parte da molécula essencial para atividade pode não ser a mesma detectada no método físico-químico, gerando conclusões falsas sobre qualidade do medicamento. O ensaio turbidimétrico representa importante alternativa para avaliação de potência de antimicrobianos, pois é um método simples e, principalmente, rápido. O método proposto neste trabalho necessita de apenas três horas de incubação, podendo ser comparado ao tempo de um método químico de análise. Neste contexto, o método aqui apresentado pode ser amplamente aplicado em laboratórios onde a disponibilidade de tempo e equipamentos é limitada.

Na validação do método microbiológico turbidimétrico, a linearidade do método foi comprovada pelos coeficientes de determinação de 0,9999 e 0,9988 para tigeciclina SQR e pó liofilizado, respectivamente, os quais foram bastante próximos da unidade. Além disso, a análise de variância demonstrou significativa regressão e ausência de desvios da linearidade e paralelismo nas curvas analíticas originadas da substância química de referência e amostra. O teste *t* de Student acusou não significativa a diferença entre os coeficientes angulares das retas obtidas com padrão e produto farmacêutico, demonstrando a ausência de interferência do excipiente da formulação. A precisão do método foi avaliada através do Desvio Padrão Relativo dos teores da amostra de pó liofilizado obtidos em quatro diferentes dias. Com resultado médio de teor de 115,78 e Desvio Padrão Relativo de 0,37%, a precisão do método foi comprovada. No estudo da exatidão, determinada pelo teste de recuperação, obteve-se resultado médio de 99,74%, o qual comprovou a capacidade do método de determinar teores pré-definidos de modo exato. As pequenas alterações efetuadas nos parâmetros do método durante a avaliação da robustez, não causaram efeitos significativos. Entretanto, foi possível observar que o parâmetro volume de inóculo é, conforme esperado, extremamente importante para obtenção de resultados precisos, uma vez que este apresentou o maior Desvio Padrão Relativo. A validação do método foi satisfatória, estando de acordo com o estabelecido em guias nacionais e internacionais, o que oferece segurança para aplicação do método proposto na avaliação de potência de tigeciclina em pó liofilizado.

6.4 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

6.4.1 Considerações gerais

A espectrofotometria emprega as propriedades dos átomos e moléculas de absorver e emitir energia eletromagnética, desta forma a absorção molecular na região do ultravioleta e do visível depende da estrutura eletrônica da molécula. A relação fotometria – luz se dá em termos de energia, que apresenta relação inversa com o comprimento de onda. Esta técnica é amplamente utilizada em análise quantitativa, devido à facilidade de execução, boa sensibilidade e exatidão, seletividade moderada e ampla aplicabilidade. É influenciada por fatores como estrutura molecular do composto, solvente, temperatura e comprimento de onda da radiação (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000; MENDEZ et al., 2003).

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se: $A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$, onde **A** é a absorvância, **I₀** é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e **I** é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absortividade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo **c** é a concentração (mol/L) da espécie absorvente e **b**, a distância (cm) percorrida pelo feixe através da amostra (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

Os métodos espectrofotométricos são frequentemente empregados em análises farmacêuticas. Sua fácil execução, aliada ao custo reduzido, propicia a utilização desta técnica no controle de qualidade de rotina de inúmeros produtos farmacêuticos. Além da determinação quantitativa, a comparação do perfil espectral permite identificar a substância em análise (ZARBIELLI et al., 2006). Nesse contexto, estudos utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta para análise de tigeciclina não foram encontrados na literatura, incentivando o desenvolvimento e validação do método proposto.

6.4.2 Material

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu (Tóquio, Japão), modelo UV mini-1240, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Utilizou-se como solvente água purificada (Milli-Q®).

6.3.2.1 Preparo da solução de tigeciclina SQR

Pesou-se quantidade equivalente a 5 mg de tigeciclina SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se com água, obtendo-se a concentração de 50,0 µg/mL de tigeciclina SQR.

6.4.2.2 Preparo das soluções de tigeciclina na forma farmacêutica

O conteúdo de três frascos contendo 50 mg tigeciclina pó liofilizado foi adicionado a um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras pesou-se o equivalente a 2,5 mg e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, completou-se o volume com água, obtendo-se solução de 50 µg/mL. Desta solução, retiraram-se 3,2 mL, que foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se solução de 16 µg/mL, após completar o volume com o mesmo solvente.

6.4.3 Método

Alíquotas da solução de tigeciclina SQR, item 6.4.2.1, foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL. Em seguida, o volume foi completado com água. As leituras foram efetuadas no comprimento de onda máximo, 245 nm, como descrito anteriormente no item 5.4.3.1, utilizando água como branco.

6.4.4 Curva de Ringbom

A faixa de linearidade do método foi determinada pela curva de Ringbom. A partir da solução de trabalho de SQR preparada no item 6.4.2.1, foram preparadas diluições com auxílio de micropipeta, em balões volumétricos de 10 mL como apresentados na Tabela 6.4.1. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 245 nm.

Tabela 6.4.1. Obtenção da curva de Ringbom para a determinação da faixa de linearidade do método espectrofotométrico na região do UV para análise de tigeciclina a 245 nm

Amostra	Solução de tigeciclina SQR (50 µg/mL)	Concentração
	(mL)	(µg/mL) ^a
1	0,2	1
2	0,4	2
3	0,6	3
4	0,8	4
5	1,0	5
6	1,2	6
7	1,4	7
8	1,6	8
9	1,8	9
10	2,0	10
11	2,4	12
12	2,8	14
13	3,2	16
14	3,6	18
15	4,0	20
16	4,4	22
17	5,0	25
18	6,0	30
19	7,0	35

^a Balão volumétrico de 10 mL

6.4.5 Obtenção da curva analítica

Para a obtenção da curva analítica de tigeciclina SQR, transferiram-se alíquotas de 2,0; 2,4; 2,8; 3,2; 3,6; 4,4 e 4,0 mL da solução descrita no item 6.4.2.1 para balões volumétricos de 10 mL e completou-se o volume com água, obtendo-se soluções com concentrações finais de 10; 12; 14;

16; 18; 20 e 22 µg/mL, respectivamente. Cada concentração foi preparada em triplicata. As leituras espectrofotométricas foram determinadas no comprimento de onda de 245 nm, utilizando água como branco.

6.4.6 Cálculo do teor de tigeciclina em pó liofilizado

As leituras das soluções de amostra foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 245 nm. As soluções foram preparadas em triplicata.

O cálculo da concentração de tigeciclina em pó liofilizado foi realizado através das equações 6.4.1 e 6.4.2.

$$C_A = A_A \cdot C_{SQR} / A_{SQR}$$

Equação 6.4.1

Em que:

C_A = concentração da amostra (µg/mL)

A_A = absorvância da amostra

C_{SQR} = concentração da substância química de referência

A_{SQR} = absorvância da substância química de referência

O valor percentual de tigeciclina nas amostras foi calculado pela equação 6.4.2:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Equação 6.4.2

Em que:

$C_A\%$ = Concentração percentual da amostra

C_A = Concentração de tigeciclina encontrado na amostra (µg/mL)

C_T = Concentração teórica de tigeciclina na amostra (µg/mL)

6.4.7 Validação

6.4.7.1 Linearidade

A linearidade do método foi obtida através da análise de três curvas analíticas em três dias diferentes. Cada curva foi construída conforme descrito no item 6.4.5. Os resultados obtidos foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela ANOVA.

6.4.7.2 Precisão

A precisão do método foi avaliada pelo cálculo do Desvio Padrão Relativo percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

6.4.7.2.1 Repetibilidade

Seis soluções de tigeciclina SQR na concentração 16 µg/mL foram preparadas e analisadas no mesmo dia. Deste modo, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista.

6.4.7.2.2 Precisão intermediária

Avaliou-se a precisão intermediária através de análises de soluções de tigeciclina pó liofilizado, na concentração de 16 µg/mL, executadas por diferentes analistas e em diferentes dias. As análises foram realizadas em triplicata.

6.4.7.2.2.1 Interdias

Prepararam-se, diariamente, duas amostras, na concentração de 16 µg/mL, e analisaram-se triplicata em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais.

6.4.7.2.2 Entre-analistas

Duas amostras, na concentração de 16 µg/mL foram preparadas e analisadas em triplicata, por dois analistas, sob as mesmas condições experimentais.

6.4.7.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidade conhecida de padrão foi adicionada à amostra. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 6.4.2, em triplicata.

Tabela 6.4.2. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV

	Tigeciclina amostra (50 µg/mL) (mL)	Tigeciclina SQR (50 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)*
Amostra	5,0	-	10,0
R1	5,0	1,4	12,8
R2	5,0	3,0	16,0
R3	5,0	4,6	19,2
Padrão	-	5,0	10,0

*Balão volumétrico de 25 mL

A percentagem de tigeciclina recuperada foi calculada pela equação 6.4.3.

$$\%R = [(C_R - C_A)/C_P] \times 100$$

Equação 6.4.3

Em que:

C_R = concentração encontrada da solução amostra adicionada de SQR (µg/mL)

C_A = concentração encontrada da amostra (µg/mL)

C_P = concentração teórica adicionada da solução da SQR (µg/mL)

6.4.7.4 Especificidade

A especificidade do método proposto foi avaliada pelo espectro de absorção da solução placebo (lactose 50 µg/mL), para verificação de ausência de absorção no comprimento de onda utilizado no método.

6.4.7.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. A equação 6.1.4 foi utilizada no cálculo.

6.4.7.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 2005), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. O cálculo foi realizado segundo a equação 6.1.5.

6.4.7.7 Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados de teor de tigeclina em pó liofilizado, obtidos variando-se o comprimento de onda de absorção.

6.4.8 Resultados

As características do espectro de absorção de tigeclina SQR em água (Figura 5.6.1) foram discutidas na seção 5.6.3.1.

6.4.8.1 Curva de Ringbom

Os resultados obtidos com a curva de Ringbom, construída para a determinação da faixa linear do método espectrofotométrico na região do ultravioleta, para tigeciclina são mostrados na Tabela 6.4.3.

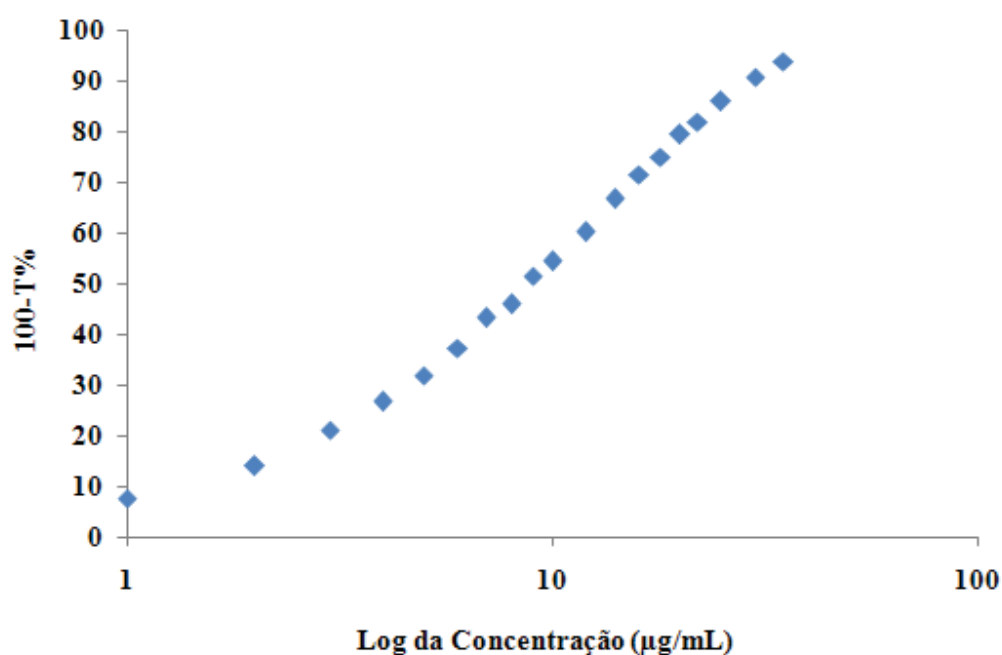
Tabela 6.4.3. Valores obtidos na construção da curva de Ringbom pelo método espectrofotométrico na região do UV para tigeciclina SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 245 nm

Concentração (µg/mL) ^a	Absorvância	100- T %
1	0,0339	7,5088
2	0,0651	13,9204
3	0,1022	20,9685
4	0,1348	26,6837
5	0,1671	31,9387
6	0,2025	37,2664
7	0,2457	43,2063
8	0,2664	45,8498
9	0,3147	51,5493
10	0,3410	54,3963
12	0,3997	60,1617
14	0,4775	66,6957
16	0,5426	71,3318
18	0,6020	74,9965
20	0,6847	79,3319
22	0,7430	81,9282
25	0,8507	85,8973
30	1,0303	90,6739
35	1,2041	93,7497

^a Balão volumétrico de 10 mL

Na Figura 6.4.1 está representada a curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para tigeciclina SQR.

Figura 6.4.1. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para tigeciclina SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 245 nm



6.4.8.2 Linearidade

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de tigeciclina SQR, em água, para a construção da curva analítica são mostrados na Tabela 6.4.4.

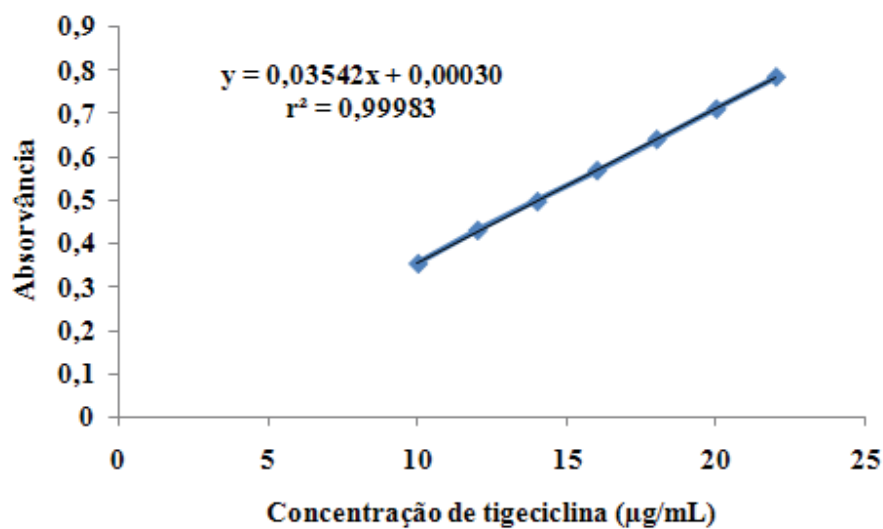
Tabela 6.4.4. Valores de absorvância determinados para a curva analítica de tigeciclina SQR, pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando água como solvente, a 245 nm

Concentração (µg/mL)	Absorvância ^a	Absorvância média ± DP ^b	DPR ^c (%)
10	0,3509	0,3526 ± 0,0063	1,78
	0,3595		
	0,3473		
12	0,4219	0,4292 ± 0,0069	1,61
	0,4301		
	0,4356		
14	0,4906	0,4951 ± 0,0061	1,24
	0,5021		
	0,4927		
16	0,5641	0,5663 ± 0,0028	0,49
	0,5694		
	0,5654		
18	0,6370	0,6376 ± 0,0033	0,52
	0,6412		
	0,6347		
20	0,7039	0,7073 ± 0,0035	0,50
	0,7109		
	0,7071		
22	0,7789	0,7808 ± 0,0021	0,27
	0,7830		
	0,7805		

^aValor médio de três determinações/ ^bDP = Desvio padrão/ ^cDPR = Desvio Padrão Relativo

A curva analítica de tigeciclina SQR (Figura 6.4.2) foi construída com as médias dos valores de absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade.

Figura 6.4.2. Curva analítica de tigeciclina SQR, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando água como solvente, a 245 nm



A ANOVA, calculada para os dados da curva analítica de tigeciclina SQR, é mostrada na Tabela 6.4.5.

Tabela 6.4.5. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de tigeciclina SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	6	0,421553	0,070259	3082,83*	2,85
Regressão linear	1	0,421482	0,421482	18493,86*	4,6
Desvio da linearidade	5	0,000071	0,000014	0,626189	2,96
Resíduo	14	0,000319	0,000023		
Total	20	0,421872			

*Significativo para $p < 0,05\%$

6.4.8.4 Precisão

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base no Desvio Padrão Relativo. Seis soluções de tigeciclina SQR preparadas na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ foram submetidas a análises sucessivas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram DPR de 1,12%.

A precisão intermediária foi avaliada através da precisão interdias e entre-analistas. Os valores de teor de tigeciclina em pó liofilizado, determinados durante a avaliação da precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 6.4.6. As precisões interdias e entre-analistas apresentaram DPR menores que 1,01 e 1,03%, respectivamente.

Tabela 6.4.6. Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método espectrofotométrico para análise de tigeciclina em pó liofilizado

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre-analistas		
		Teor ^a (mg/frasco)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)		Teor ^a (mg/frasco)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)
1	1	59,03	111,38		A	59,11	111,53	1,03
	2	58,51	110,39	1,01	B	59,97	113,16	
	3	57,85	109,16					
2	1	61,02	115,14		A	61,93	116,84	0,52
	2	60,83	114,77	0,22	B	61,47	115,98	
	3	61,09	115,26					

^a média de três determinações

^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

6.4.8.5 Exatidão

Na Tabela 6.4.7 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotométrico, utilizando água como solvente, a 245 nm. Os valores de recuperação encontraram-se entre 100,32 e 101,42%, demonstrando o cumprimento deste parâmetro.

Tabela 6.4.7. Determinação da exatidão do método analítico para análise tigeciclina por espectrofotometria na região do ultravioleta

	Tigeciclina SQR adicionado (µg/mL)	Tigeciclina SQR encontrado^a (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR^b (%)
R1	2,8	2,81	100,32		
R2	6,0	6,05	100,78	100,84	0,55
R3	9,2	9,33	101,42		

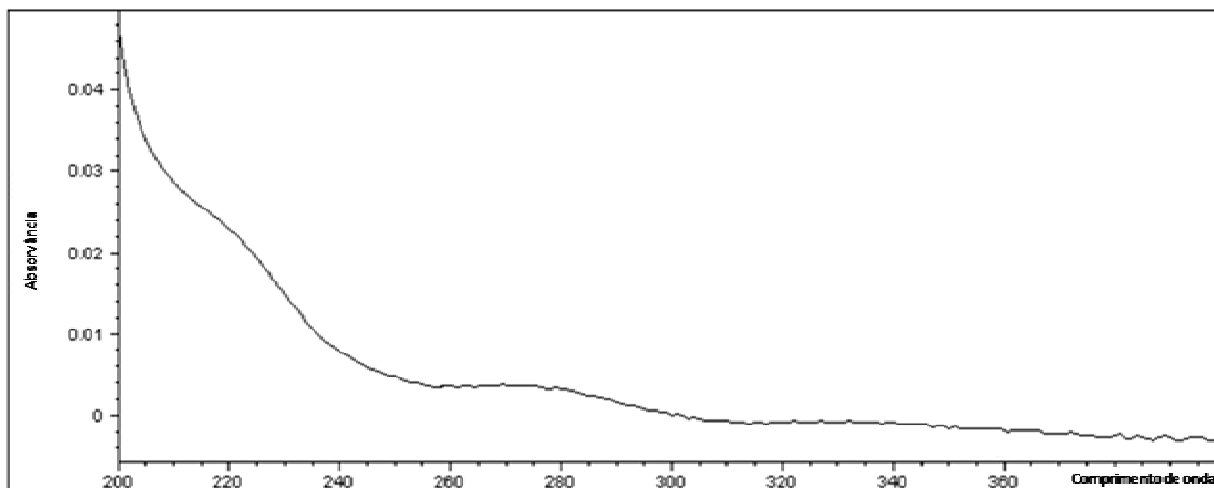
^a média de três determinações

^bDPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

6.4.8.6 Especificidade

Na avaliação da especificidade do método espectrofotométrico, avaliou-se o espectro de absorção da solução placebo, a qual não apresentou máximos na região do comprimento de onda utilizado no método (Figura 6.4.3).

Figura 6.4.3. Espectro da solução placebo para verificação de ausência de absorção do excipiente da formulação na região do ultravioleta utilizada no método



6.4.8.7 Limites de detecção e quantificação

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi determinada pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Os valores calculados para LD e LQ foram 0,33 $\mu\text{g/mL}$ e 1,00 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

6.4.8.8 Robustez

Alterações no comprimento de onda de absorção foram realizadas para avaliação da robustez do método. Na execução de análises do produto farmacêutico, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os coeficientes de variação foram inferiores a 0,27%, comprovando a robustez do método proposto, frente ao parâmetro avaliado, conforme demonstra a Tabela 6.4.8.

Tabela 6.4.8. Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise de tigeciclina por espectrofotometria na região ultravioleta

Amostra	Comprimento de onda (nm)	Teor ^a (mg/frasco)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)
1	243	57,75	108,96	0,10
	245	57,85	109,16	
	247	57,83	109,12	
2	243	61,21	115,49	0,27
	245	61,09	115,26	
	247	61,41	115,87	

^a média de três determinações

^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

6.4.9 Discussão

A espectrofotometria é um dos métodos de maior simplicidade em termos de execução e custo, já que os solventes e equipamentos necessários possuem um custo relativamente baixo, além da rapidez de execução das análises. Além disso, a elevada quantidade de fármacos, cujas estruturas apresentam grupos funcionais cromóforos, faz com este tipo de método seja amplamente aplicável.

O desenvolvimento de métodos quantitativos empregando a espectrofotometria de absorção é baseado na suposição de que a capacidade de absortividade de um sistema é diretamente proporcional à concentração de soluto (Lei de Lambert-Beer) (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

Na literatura não foram encontrados métodos espectrofotométricos para avaliação de tigeciclina, assim, desenvolveu-se e validou-se um método simples, utilizando água como solvente, baseando-se na boa intensidade de absorção do fármaco neste solvente, assim como na simplicidade no preparo das amostras e baixos custo e quantidade de resíduos gerada.

A especificidade do método foi avaliada através da pesquisa da possível interferência do excipiente do pó liofilizado na determinação quantitativa de tigeciclina. De acordo com os

espectros obtidos para tigeciclina SQR e para solução do placebo constatou-se que o método foi específico, demonstrando não haver interferência do excipiente no máximo de absorção de 245 nm.

Através da análise da porção retilínea da curva de Ringbom, selecionou-se a faixa de concentração ótima para o método espectrofotométrico. Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que as soluções de tigeciclina SQR apresentaram correlação linear entre as absorvâncias e concentrações, no intervalo utilizado. Foram plotados gráficos da concentração *versus* absorvância, os quais demonstraram haver linearidade adequada na faixa de 10 a 22 µg/mL. A equação da reta para o método foi: $y = 0,03542 + 0,0003x$, com coeficiente de determinação de 0,9998.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados baseados nas curvas analíticas produzidas em diferentes dias. Os valores encontrados para limites de detecção e quantificação foram 0,33 µg/mL e 1,00 µg/mL, respectivamente, o que demonstra que a faixa utilizada encontra-se acima dos limites e, portanto, com valores adequados de concentração.

A precisão do método foi demonstrada através da repetibilidade e precisão intermediária (interdias e entre-analistas). O valor experimental obtido de Desvio Padrão Relativo para análise de seis replicatas de tigeciclina SQR, realizada no mesmo dia e sob as mesmas condições, foi 1,12%. Para as análises realizadas em dias e por analistas diferentes, os valores de DPR foram menores que 1,03%. Os resultados obtidos demonstraram a precisão do método, pois os coeficientes de variação foram menores que 2% (SHABIR, 2003).

A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação. Os resultados obtidos encontram-se na faixa de 100,32-101,42%, estando de acordo com a faixa recomendada para exatidão de métodos analíticos (98-102%) (BRASIL, 2003).

A robustez do método foi avaliada quanto ao parâmetro comprimento de onda. Os resultados obtidos não demonstraram diferença significativa na quantificação da amostra com as alterações realizadas, demonstrando assim, ser robusto para o parâmetro analisado.

O método espectrofotométrico proposto cumpriu todos os requisitos exigidos pelos órgãos oficiais (ICH, 2005; F. BRAS, 2010; USP 33, 2010), mostrando-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, podendo ser empregado para doseamento de tigeciclina em pó liofilizado.

6.5 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO VISÍVEL

6.5.1 Considerações gerais

A espectrofotometria na região do visível possui como vantagens o baixo custo e a fácil execução, possibilitando a obtenção de alta sensibilidade e seletividade. A seletividade e sensibilidade do método espectrofotométrico no visível depende somente das reações químicas responsáveis pelo desenvolvimento da cor e não da tecnologia dos equipamentos. Os custos envolvidos no desenvolvimento e aplicação do ensaio espectrofotométrico depende somente dos reagentes utilizados (MRUTYUNJAYA RAO, 2008).

As tetraciclinas são conhecidas pela sua estrutura formada por 4 anéis com ampla variedade de grupos funcionais capazes de formar complexos com vários íons metálicos em solução aquosa. Muitos métodos espectrofotométricos utilizados para determinação de tetraciclinas baseiam-se nesta propriedade (LIAWRUANGRATH et al., 2006). As tetraciclinas exibem três constantes de acidez macroscópicas amplamente aceitas. Em ambiente aquoso a primeira deprotonação (pK_1 3-4) ocorre no OH da posição 3. O segundo valor de pK_a é atribuído ao OH da posição 12 (pK_2 7,3-8,1) e o terceiro ao nitrogênio do grupo dimetilamino (pK_3 8,8-9,8). Assim, os possíveis sítios de ligação dependem do solvente utilizado e seu pH. Embora uma variedade de técnicas tem estudado as propriedades complexantes das tetraciclinas, os resultados obtidos têm levado a conclusões contraditórias sobre a localização de seus sítios quelantes (WESSELS et al., 1998).

Métodos espectrofotométricos na região do visível para determinação de tetraciclinas são baseados na reação dos fármacos com diferentes reagentes, originando compostos coloridos. Alguns reagentes utilizados são cloreto de cobre, acetato de uranila, complexos com cobre (II), cobalto (II), ferro (III), níquel (II), cloreto de alumínio (III), molibdato de sódio, sulfato férrico amoniacal, ácido cloranílico (MAGNAM et al., 1984; SULTAN, 1988; SAHA, 1989; SAHA et al., 1990; LIAWRUANGRATH et al., 2006; RUENGSIAGOON, 2008; FAHELELBOM, 2008; SUNARIC et al., 2009). Vários reagentes foram testados para determinação de tigeciclina, porém para a maioria não se obteve bons resultados, necessitando de estudos complementares para estabelecimento de condições adequadas de reação. Muitos métodos espectrofotométricos na região do visível utilizam solventes orgânicos em suas reações, alguns envolvendo processos de

extração do produto de reação. Neste contexto, o método proposto possui vantagens de rapidez, baixo custo, facilidade de execução e segurança ambiental, pois não utiliza solventes orgânicos.

6.5.2 Material

As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu (Tóquio, Japão), modelo UV mini-1240, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O ajuste de pH do tampão foi realizado em peagômetro digital Micronal, modelo B474. Utilizou-se água purificada (Milli-Q®) e os reagentes acetato de cobre (Merck) e acetato de sódio (Synth). A substância química de referência e a forma farmacêutica utilizadas estão descritas nos itens 4.2 e 4.3.

6.5.2.1 Preparo do reagente acetato de cobre

Transferiram-se 5,0 g de acetato de cobre para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água purificada. Levou-se ao ultrassom por 30 minutos para solubilização e completou-se com água, obtendo-se reagente com concentração final de 5,0%.

6.5.2.2 Preparo da solução de tigeciclina SQR

Pesou-se quantidade equivalente a 5,0 mg de tigeciclina SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL com auxílio de água purificada, completando-se o volume com mesmo solvente, obtendo-se a concentração de 200,0 µg/mL.

6.5.2.3 Preparo das soluções de tigeciclina na forma farmacêutica

O conteúdo de três frascos contendo 50 mg tigeciclina pó liofilizado foi adicionado a um recipiente adequado; a partir deste *pool* de amostras pesaram-se o equivalente a 5,0 mg e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL, completou-se o volume com água, obtendo-se solução de 200 µg/mL. Desta solução, 1,1 mL foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL contendo 1 mL de tampão acetato pH 3,0, no qual adicionou-se 1 mL de solução de acetato de cobre, obtendo-se solução de 22 µg/mL, após completar o volume com água purificada.

6.5.2.4 Preparo do tampão pH 3,0

Pesou-se 4,0 g de acetato de sódio anidro e dissolveu-se em 800 mL de água, após quantidade suficiente de ácido acético glacial (aproximadamente 130 mL) foi adicionado para ajuste de pH. A solução foi transferida para balão volumétrico de 1000 mL, completando-se o volume com água purificada.

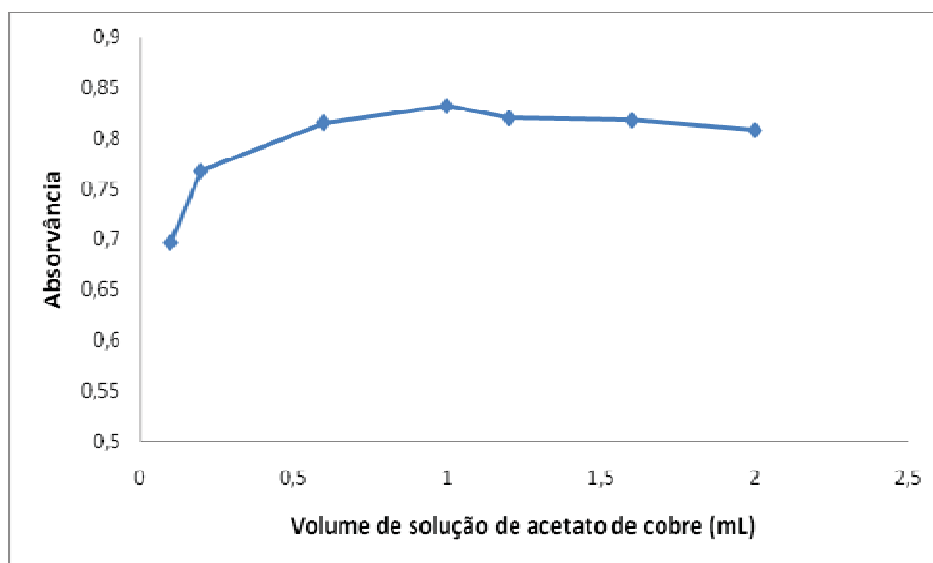
6.5.3 Desenvolvimento do método

As características do espectro de absorção de tigeciclina SQR após reação com acetato de cobre em pH 3,0 (Figura 5.7.1) foram discutidas na seção 5.7.

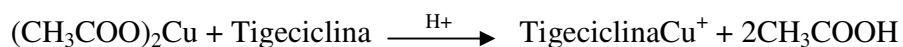
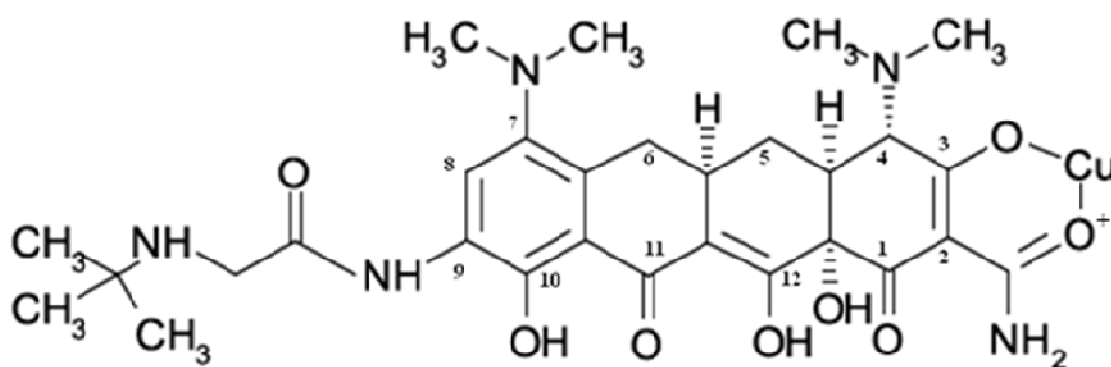
Para determinação das condições do método, avaliaram-se diferentes concentrações de solução de acetato de cobre e pHs. Fixou-se o volume da solução de tigeciclina e pH, variando-se o volume da solução de acetato de cobre de 0,1 a 2 mL (Figura 6.5.1), sendo as análises realizadas contra um branco preparado para cada volume de solução de acetato de cobre testado. Após determinação do volume da solução de acetato de cobre avaliaram-se diferentes tampões (acetato de sódio, acetato de amônio, fosfato de potássio, tris) com pHs 3,0; 5,0; 7,5 e 8,6, respectivamente. Além disso, avaliou-se também a influência da temperatura na reação e a fotossensibilidade do produto gerado. Os resultados demonstraram que para maior concentração da curva analítica (34 µg/mL), o valor máximo de absorvância foi obtido com 1,0 mL da solução de acetato de cobre 5%, acima deste volume as leituras permaneceram constantes ou diminuíram. O pH não apresentou grande influência, havendo leituras similares em pH 3,0; 5,0 e 8,6, porém quando se utilizou tampão fosfato pH 7,5 a leitura foi menor e com tampão fosfato pH 6 houve turvação, não possibilitando a determinação da leitura, o que pode estar relacionado com precipitação de cobre como óxido ou hidróxido, que ocorre em pH mais altos que 5 e/ou 6 (COUTO, 1998). Optou-se em utilizar o pH ácido, devido aos bons resultados e também para melhor visualização da mudança de cor do reagente, que passa do azul ao verde na presença de tigeciclina, uma vez que em pH ácido a tigeciclina apresenta-se incolor e em pH acima de 5,0 com coloração amarelada. Assim, fica evidente que a coloração verde gerada se deve à reação e não à mistura do fármaco amarelo com o reagente azul. A temperatura de 40 °C por 15 minutos causou diminuição nas absorvâncias das soluções. A reação foi estável por 30 minutos, independente da presença de luz ou não, avaliada

pela utilização de vidraria transparente e âmbar. Após varredura de 300 a 450 nm, a solução de tigeciclina com pH 3,0 apresentou comprimento de onda de máxima absorvância de 350 nm. Após a adição da solução de cobre (5%) este máximo aumentou para 378 nm, indicando a ocorrência de reação conforme mostra a Figura 5.7.2 deste trabalho.

Figura 6.5.1. Curva das leituras de absorvância *versus* diferentes volumes de solução de acetato de cobre a 5%, com concentração constante de tigeciclina (34 µg/mL) e pH 3,0



O mecanismo de reação entre tigeciclina e cobre não foi elucidado, pois este é o primeiro estudo que aplica esta reação. Entretanto, para análogos das tetraciclinas (Figura 3.1) é relatado que o primeiro grupo estrutural a se ligar ao cobre é o átomo O da posição 3, que sofre desprotonação em pH relativamente baixo. Com o aumento de pH, o grupo O da posição 12 dissocia e a quelação passa a ocorrer no sistema O 10 - O 12. Em pH altos, o sítio de quelação é transferido para o grupo desprotonado dimetilamônio no C da posição 4 (JEZOWSKA-BOJCZUK et al., 1993). Com base nestas informações, sugere-se que a reação entre tigeciclina e cobre, em pH 3,0, seja a descrita a seguir, formando o composto com estrutura representada na Figura 6.5.2. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmação desta proposição, uma vez que os grupos ionizáveis na molécula de tigeciclina podem possuir comportamento diferente em relação às tetraciclinas.

Reação:**Figura 6.5.2.** Estrutura sugerida para o produto da reação entre tigeciclina e cobre**6.5.4 Método**

Em balão volumétrico de 10 mL adicionaram-se, com auxílio de micropipetador, 1 mL de tampão, alíquotas da solução de tigeciclina SQR, item 6.5.2.1 e 1 mL de solução de acetato de cobre, após completou-se o volume com água. As leituras foram efetuadas imediatamente no comprimento de onda máximo, 378 nm, como descrito anteriormente no item 5.6, contra uma solução composta pela adição de 1 mL de tampão e 1 mL de solução de acetato de cobre, em balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água purificada.

6.5.5 Curva de Ringbom

A faixa de linearidade do método foi determinada pela curva de Ringbom. A partir da solução de trabalho de SQR preparada no item 6.5.2.1, foram preparadas soluções com auxílio de

micropipeta, em balões volumétricos de 10 mL, com concentrações de 2 a 42 µg/mL, como apresentados na Tabela 6.5.1.

Tabela 6.5.1. Obtenção da curva de Ringbom para a determinação da faixa de linearidade do método espectrofotométrico na região do visível para análise de tigeciclina a 378 nm

Amostra	Solução de tigeciclina SQR (200 µg/mL)	Concentração
	(mL)	(µg/mL) ^a
1	0,1	2
2	0,2	4
3	0,3	6
4	0,4	8
5	0,5	10
6	0,6	12
7	0,7	14
8	0,8	16
9	0,9	18
10	1,0	20
11	1,1	22
12	1,2	24
13	1,3	26
14	1,4	28
15	1,5	30
16	1,6	32
17	1,7	34
18	1,8	36
19	1,9	38
20	2,0	40
21	2,1	42

^a Balão volumétrico de 10 mL

6.5.6 Obtenção da curva analítica

Para a obtenção da curva analítica de tigeciclina SQR, utilizou-se o método descrito no item 6.5.3 e alíquotas de 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; 1,3; 1,5 e 1,7 mL da solução descrita no item 6.5.2.1, obtendo-se soluções com concentrações finais de 10; 14; 18; 22; 26; 30 e 34 µg/mL, respectivamente. Cada concentração foi preparada em triplicata. As leituras espectrofotométricas foram determinadas no comprimento de onda de 378 nm, utilizando como branco solução preparada da mesma forma que as soluções de tigeciclina, porém isenta de fármaco.

6.5.7 Cálculo do teor de tigeciclina em pó liofilizado

As leituras das soluções de amostra foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 378 nm. As soluções foram preparadas em triplicata. O cálculo da concentração de tigeciclina em pó liofilizado foi realizado através das equações 6.4.1 e 6.4.2, descritas no item 6.4.6.

6.5.8 Validação

6.5.8.1 Linearidade

A linearidade do método foi obtida através da análise de três curvas analíticas em três dias diferentes. Cada curva foi construída conforme descrito no item 6.5.6. Os resultados obtidos foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela ANOVA.

6.5.8.2 Precisão

A precisão do método foi avaliada pelo cálculo do Desvio Padrão Relativo percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

6.5.8.2.1 Repetibilidade

Seis soluções de tigeciclina SQR na concentração 22 µg/mL foram preparadas e analisadas no mesmo dia. Deste modo, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista.

6.5.8.2.2 Precisão intermediária

Avaliou-se a precisão intermediária pela análise de soluções de tigeciclina pó liofilizado, na concentração de 22 µg/mL, executadas por diferentes analistas e em diferentes dias. As análises foram realizadas em triplicata.

6.5.8.2.2.1 Interdias

Prepararam-se, diariamente, duas amostras, na concentração de 22 µg/mL, e analisaram-se triplicata em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais.

6.5.8.2.2.2 Entre-analistas

Duas amostras, na concentração de 22 µg/mL foram preparadas e analisadas em triplicata, por dois analistas, sob as mesmas condições experimentais.

6.5.8.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidades conhecidas de padrão foram adicionadas à amostra. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 6.5.2, em triplicata.

Tabela 6.5.2. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do visível

	Tigeciclina amostra (50 µg/mL) (mL)	Tigeciclina SQR (50 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)*
Amostra	2,8	-	14,0
R1	2,8	0,72	17,6
R2	2,8	1,60	22,0
R3	2,8	2,48	26,4
Padrão	-	2,80	14,0

*Balão volumétrico de 10 mL

A percentagem de tigeciclina recuperada foi calculada conforme equação 6.4.3, descrita no item 6.4.7.3.

6.5.8.4 Especificidade

A especificidade do método proposto foi avaliada pelo espectro de absorção da solução preparada com adição da solução placebo (lactose 70 µg/mL) em vez da solução de tigeciclina, para verificação de ausência de reação entre lactose e acetato de cobre. Adicionalmente, conforme mostra a Figura 5.7.2, comparou-se os espectros de tigeciclina na presença e ausência de acetato de cobre, ambos no mesmo pH, para confirmação da formação de produto após reação entre tigeciclina e acetato de cobre.

6.5.8.5 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir das fórmulas descritas na literatura (ICH, 2005), fundamentadas no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva analítica. Os cálculos foram realizados segundo as equações 6.1.4 e 6.1.5.

6.5.8.6 Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados de teor de tigeciclina em pó liofilizado obtidos variando-se o comprimento de onda de absorção (376, 378 e 380 nm), volume de solução de acetato de cobre (0,8; 1,0 e 1,2 mL) e pH do tampão acetato (2,5; 3,0 e 3,5).

6.5.9 Resultados

6.5.9.1 Curva de Ringbom

Os resultados obtidos com a curva de Ringbom, construída para a determinação da faixa linear do método espectrofotométrico na região do visível, para tigeciclina são mostrados na Tabela 6.5.3.

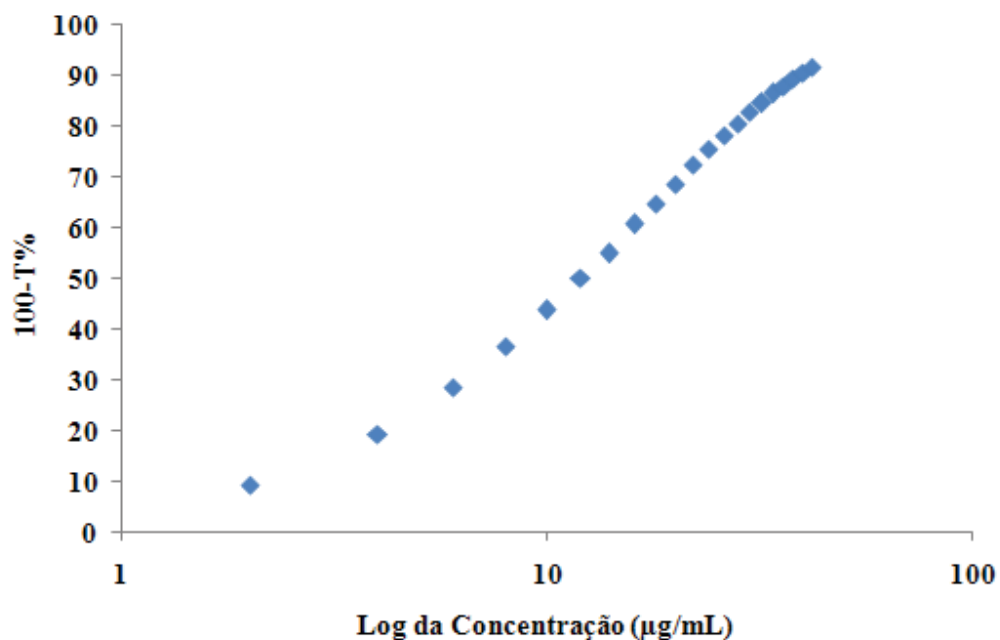
Tabela 6.5.3. Valores obtidos na construção da curva de Ringbom pelo método espectrofotométrico na região do visível para tigeiciclina SQR

Concentração ($\mu\text{g/mL}$) ^a	Absorvância	100- T %
2	0,043	9,385
4	0,094	19,369
6	0,146	28,550
8	0,197	36,467
10	0,249	43,636
12	0,301	49,997
14	0,345	54,814
16	0,405	60,645
18	0,452	64,682
20	0,500	68,377
22	0,559	72,394
24	0,609	75,396
26	0,661	78,173
28	0,706	80,321
30	0,764	82,781
32	0,807	84,404
34	0,867	86,417
36	0,909	87,669
38	0,965	89,161
40	1,016	90,366
42	1,069	91,469

^a Balão volumétrico de 10 mL

Na Figura 6.5.3 está representada a curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível para tigeiciclina SQR.

Figura 6.5.3. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível para tigeciclina SQR, após reação com acetato de cobre a 5%, em pH 3,0



6.5.9.2 Linearidade

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de tigeciclina SQR, para a construção da curva analítica são mostrados na Tabela 6.5.4.

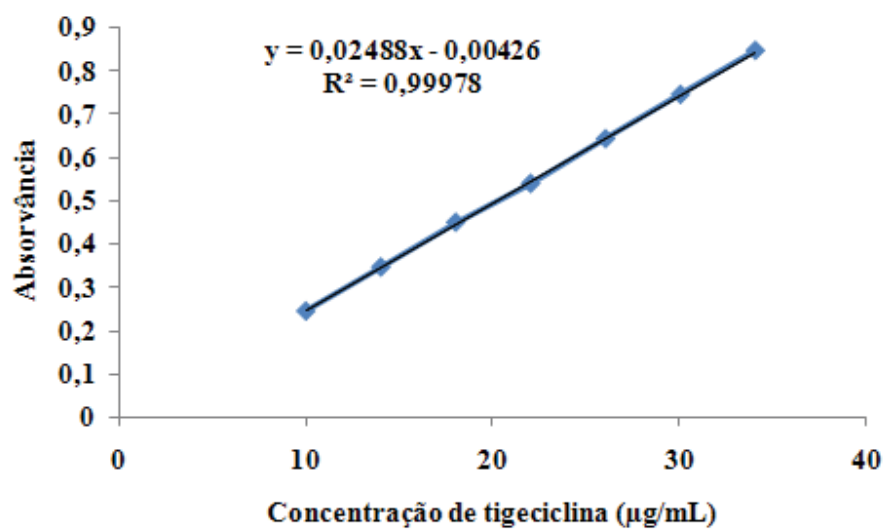
Tabela 6.5.4. Valores de absorvância determinados em 378 nm para obtenção da curva analítica de tigeciclina SQR, pelo método espectrofotométrico na região do visível

Concentração (µg/mL)	Absorvância ^a	Absorvância média ± DP ^b	DPR ^c (%)
10	0,2404	0,2438 ± 0,0036	1,47
	0,2435		
	0,2475		
14	0,3459	0,3451 ± 0,0014	0,41
	0,3435		
	0,3460		
18	0,4521	0,4481 ± 0,0035	0,78
	0,4457		
	0,4466		
22	0,5366	0,5377 ± 0,0083	1,54
	0,5300		
	0,5464		
26	0,6396	0,6405 ± 0,0108	1,68
	0,6302		
	0,6517		
30	0,7429	0,7425 ± 0,0063	0,84
	0,7360		
	0,7485		
34	0,8471	0,8435 ± 0,0042	0,50
	0,8389		
	0,8446		

^aValor médio de três determinações/ ^bDP = Desvio padrão/ ^cDPR = Desvio Padrão Relativo

A curva analítica de tigeciclina SQR (Figura 6.5.4) foi construída com as médias dos valores de absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante a avaliação da linearidade do método.

Figura 6.5.4. Curva analítica de tigeciclina SQR, obtida a 378 nm pelo método espectrofotométrico na região do visível



A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de tigeciclina é mostrada na Tabela 6.5.5.

Tabela 6.5.5. Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de tigeciclina SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do visível

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	6	0,831940	0,138657	3624,245571*	2,85
Regressão linear	1	0,831760	0,831760	21740,763514*	4,6
Desvio da linearidade	5	0,000180	0,000036	0,941982	2,96
Resíduo	14	0,000536	0,000038		
Total	20	0,832476			

*Significativo para $p < 0,05\%$

6.5.9.4 Precisão

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base no Desvio Padrão Relativo. Seis soluções de tigeciclina SQR preparadas na concentração de 22 µg/mL foram submetidas a análises sucessivas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram DPR de 0,34%.

A precisão intermediária foi avaliada através da precisão interdias e entre-analistas. Os valores de teor de tigeciclina em pó liofilizado, determinados durante a avaliação da precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 6.5.6. Os DPR dos parâmetros interdias e entre-analistas foram inferior a 0,73 e 1,83 %, respectivamente.

Tabela 6.5.6. Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método espectrofotométrico para análise de tigeciclina em pó liofilizado

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre-analistas		
		Teor ^a (mg/frasco)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)		Teor ^a (mg/frasco)	Teor ^a (%)	DPR ^b (%)
1	1	58,34	110,07		A	59,18	111,66	1,83
	2	58,64	110,64	0,73	B	57,66	108,80	
	3	59,18	111,66					
2	1	63,49	119,80		A	63,40	119,62	0,11
	2	63,40	119,62	0,36	B	63,30	119,44	
	3	63,06	118,99					

^a média de três determinações

^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

6.5.9.5 Exatidão

Na Tabela 6.5.7 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotométrico na região do visível. Os percentuais de recuperação encontram-se entre 98,27 e 99,69%, permitindo recuperação média de 99,10%, o que satisfaz plenamente as exigências quanto à exatidão do método proposto.

Tabela 6.5.7. Determinação da exatidão do método analítico para análise de tigeciclina por espectrofotometria na região do visível

	Tigeciclina SQR adicionado (µg/mL)	Tigeciclina SQR encontrado^a (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR^b (%)
Recuperação 1	3,6	3,59	99,69		
Recuperação 2	8,0	7,95	99,34	99,10	0,75
Recuperação 3	12,4	12,18	98,27		

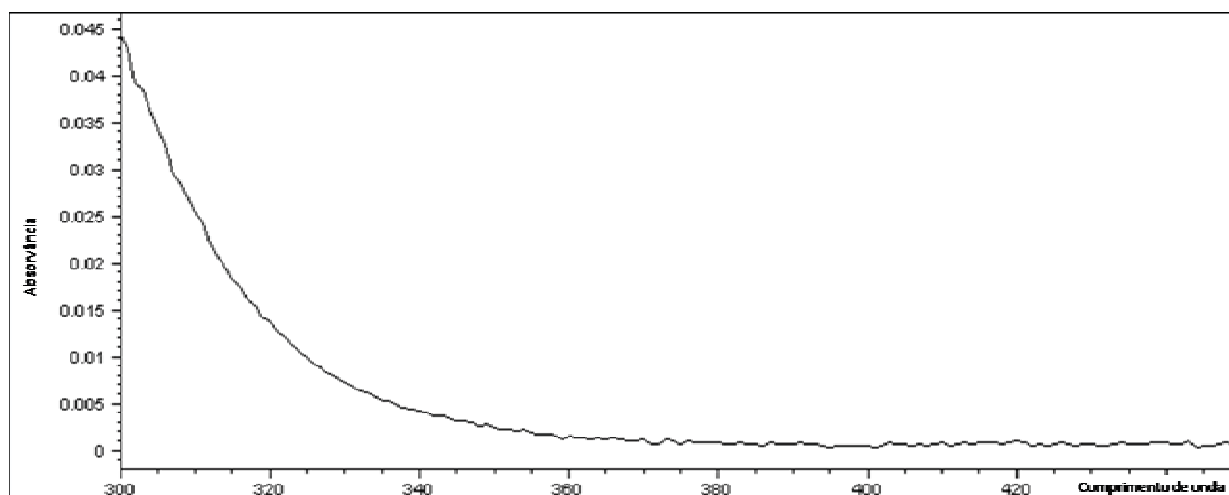
^a média de três determinações

^bDPR = Desvio Padrão Relativo

6.5.9.6 Especificidade

Na avaliação da especificidade do método espectrofotométrico avaliou-se o espectro de absorção solução preparada com adição da solução placebo em substituição à solução de tigeciclina, a qual não apresentou máximos na região do comprimento de onda utilizado no método (Figura 6.5.5).

Figura 6.5.5. Espectro da solução preparada com placebo em substituição a solução de tigeciclina, para verificação de ausência de reação entre lactose e acetato de cobre



6.5.9.7 Limites de detecção e quantificação

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi determinada através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Os valores calculados para LD e LQ foram 0,29 $\mu\text{g/mL}$ e 0,89 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

6.5.9.8 Robustez

Alterações no comprimento de onda de absorção, pH do tampão e volume de solução de acetato de cobre adicionado foram realizadas para avaliação da robustez do método. Na execução de análises do produto farmacêutico, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os coeficientes de variação foram inferiores a 1,04%, comprovando a robustez do método proposto, frente ao parâmetro avaliado, conforme demonstra a Tabela 6.5.8.

Tabela 6.5.8. Parâmetros da avaliação da robustez do método analítico para análise de tigeciclina por espectrofotometria na região do visível

Variável	Faixa Investigada	Tigeciclina ^a (mg /frasco)	Tigeciclina ^a (%)	DPR ^b (%)
pH do tampão	2,5	58,43	110,24	0,28
	3,0	58,64	110,64	
	3,5	58,32	110,04	
Volume de solução de acetato de cobre a 5% (mL)	0,8	58,82	110,99	1,04
	1,0	58,64	110,64	
	1,2	57,69	108,85	
Comprimento de onda (nm)	376	58,58	110,53	0,13
	378	58,64	110,64	
	380	58,73	110,82	

^a média de três determinações

^b DPR (%) = Desvio Padrão Relativo percentual

6.5.10 Discussão

O aperfeiçoamento dos métodos físico-químicos para análise de produtos farmacêuticos, através da utilização de equipamentos modernos é uma tendência em laboratórios de controle de qualidade de fármacos e medicamentos. Os equipamentos modernos de escolha (cromatografia líquida de alta eficiência, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas) para ensaio de pureza envolvem alto custo de aquisição e manutenção. Os métodos de espectrofotometria no visível são muito simples, de baixo custo e fácil de realizar, entretanto, estes métodos apresentam limitações relacionadas às reações químicas, as quais necessitam ser seletivas para o fármaco em análise e estáveis o suficiente para obtenção de resultados confiáveis (KUMAR et al., 2006; MRUTYUNJAYA RAO, 2008). O controle de pH é um fator limitante para realização das reações, pois muitas vezes ocorre alteração da cor provocada pela mudança de pH ou reação com o solvente e não pela formação de produto de reação, podendo ocorrer conclusões equivocadas.

Métodos espectrofotométricos na região do visível para avaliação de tigeciclina não foram encontrados nas bases pesquisadas assim, com base em estudos com tetraciclinas, desenvolveu-se e validou-se um método simples, utilizando acetato de cobre como reagente e água como solvente.

Na avaliação da especificidade do método, estudou-se a possível reação entre o excipiente da formulação farmacêutica, lactose e o acetato de cobre. De acordo com os espectros obtidos para tigeciclina SQR e para solução do placebo, constatou-se que o método foi específico, demonstrando não haver interferência do excipiente no máximo de absorção de 378 nm.

O coeficiente de determinação de 0,9997 da reta obtida no gráfico da concentração *versus* absorvância e os resultados obtidos na ANOVA, comprovaram a linearidade e a regressão do método proposto na faixa de 10 a 34 µg/mL.

O Desvio Padrão Relativo foi o parâmetro analisado para determinação da precisão do método, a qual foi demonstrada através da repetibilidade e precisão intermediária (interdias e entre-analistas). Os valores de Desvio Padrão Relativo de 0,34 e inferior a 1,83% para repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente, demonstraram a precisão do método. Em adição, a exatidão do método foi comprovada pela recuperação média de 99,10%.

Modificações no comprimento de onda, volume de solução de acetato de cobre e pH do tampão foram realizadas a fim de avaliar a robustez do método. Avaliaram-se os coeficientes de variação entre os teores de tigeciclina obtidos nas diferentes condições, obtendo-se resultados inferiores a 1,04%, os quais demonstraram a capacidade do método de se manter inalterado frente a pequenas modificações de alguns de seus parâmetros.

O método espectrofotométrico na região do visível mostrou-se adequado, apresentando bons resultados para os parâmetros de validação avaliados, podendo ser aplicado para determinação do conteúdo de tigeciclina em pó liofilizado.

ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS

6.6 ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre os métodos propostos para determinação de tigeciclina em pó liofilizado foi realizada análise estatística dos teores médios de tigeciclina obtidos pelos diferentes métodos usando análise de variância (ANOVA).

6.6.1 Resultados

Os resultados obtidos na determinação quantitativa de tigeciclina em pó liofilizado, pelos métodos propostos neste trabalho, encontram-se na Tabela 6.6.1.

Tabela 6.6.1. Avaliação comparativa dos teores médios obtidos nos cinco métodos validados usando espectrofotometria na região do ultravioleta e visível, doseamento microbiológico pelos métodos por difusão em ágar e turbidimétrico e CLAE

Amostra	Métodos				
	CLAE	Ultravioleta	Visível	Difusão em ágar	Turbidimétrico
1	118,87%	116,84%	117,64%	115,16%	115,67%
2	123,04%	122,95%	122,41%	125,55%	127,43%

A Tabela 6.6.2 mostra o resultado de ANOVA calculado, utilizando os valores experimentais obtidos do teor de tigeciclina em pó liofilizado, a partir dos métodos validados.

Tabela 6.6.2. Análise da variância dos resultados obtidos no doseamento de tigeciclina pó liofilizado, pelos métodos propostos

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado*
Tratamentos	4	3,81	0,95	0,03	5,19
Resíduo	5	161,86	32,37		
Total	9	165,67			

* $p = 0,05$.

6.6.2 Discussão

Os resultados obtidos através de ANOVA demonstram não haver diferença significativa entre os métodos propostos, para o nível de significância de 5%. Desta forma, os métodos validados são equivalentes, ou seja, o resultado comprova que os métodos são intercambiáveis, sendo adequados para a determinação quantitativa do fármaco em pó liofilizado. Todos os métodos foram validados em relação aos parâmetros estabelecidos em regulamento oficiais, e apesar de demonstrarem intercambialidade cada método possui características próprias. Entretanto, alguns métodos são mais específicos e adequados para análise de rotina em laboratórios. Os métodos espectrofotométricos são simples, de fácil execução e de custo reduzido, mas não são específicos para determinar e quantificar possíveis produtos de degradação na amostra. Os ensaios microbiológicos são importantes, pois fornecem informação sobre a potência do produto farmacêutico, devendo ser aplicados em paralelo com métodos físicos, a fim de assegurar a eficácia terapêutica de antimicrobianos, entretanto, necessitam de maior tempo de execução. A CLAE é específica e apropriada para determinação de produtos de degradação e impurezas. Assim, ambos os métodos, CLAE e microbiológico, deveriam ser incluídos em compêndios oficiais a fim de assegurar a potência e a qualidade dos produtos contendo tigeciclina.

DISCUSSÃO GERAL

6.7 DISCUSSÃO GERAL

Métodos analíticos validados são fundamentais para identificação, quantificação e avaliação de estabilidade de produtos farmacêuticos. A tigeciclina é o primeiro fármaco da classe das gliciliclinas e até o momento, não existem métodos analíticos padronizados em compêndios oficiais e os artigos científicos disponíveis abordam apenas métodos analíticos para análise de tigeciclina em matrizes biológicas.

Foram desenvolvidos e validados métodos analíticos usualmente utilizados para determinação do teor descritos em códigos oficiais e na literatura, relacionados ao controle de qualidade de fármacos e medicamentos. Além disso, a simplicidade de execução, tempo de análise, custo e a capacidade de aplicação em estudos de estabilidade foram também considerados, tendo em vista buscar métodos aplicáveis ao controle de qualidade de rotina.

Na análise qualitativa foram avaliadas faixa de fusão, análise térmica (DSC/TG), cromatografia em camada delgada, espectrofotometria nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho e CLAE. A partir dos resultados obtidos, foi possível conhecer algumas características da tigeciclina, sendo possível estabelecer bases para identificação de tigeciclina em produtos farmacêuticos.

Na análise quantitativa foram desenvolvidos e validados cinco métodos analíticos: espectrofotometria na região do ultravioleta e visível, CLAE e doseamento microbiológico por difusão em ágar e turbidimetria. As validações foram realizadas com base nos guias ICH (2005), resolução nº 899 (BRASIL, 2003) e F. BRAS. (2010), as quais estabelecem diretrizes sobre a validação de procedimentos analíticos.

Os métodos microbiológicos mostraram-se capazes de quantificar o fármaco em pó liofilizado através da sua atividade frente aos micro-organismos utilizados. O método turbidimétrico elimina a principal desvantagem dos métodos microbiológicos, que é o tempo de realização, pois possui tempo de incubação de apenas três horas, podendo assim ser mais facilmente aplicável em controle de qualidade.

Os métodos mostraram-se específicos, uma vez que não houve interferência do excipiente presente na formulação de tigeciclina pó liofilizado. O método CLAE mostrou ser indicativo de estabilidade, uma vez que foi capaz de separar o fármaco de seus produtos de degradação gerados a partir de degradações fotolítica e em meios ácido, básico, oxidativo e neutro.

Os métodos demonstraram possuir boa linearidade, com coeficientes de determinação próximos da unidade, precisão, com baixos coeficientes variação entre dias e analistas, e exatidão, com percentagens de recuperação próximas a 100%.

Não existem especificações oficiais para o teor de tigeciclina em produto farmacêutico. Levando-se em conta os limites normalmente preconizados pelas farmacopeias para a determinação do teor de fármacos em formas farmacêuticas que se encontram na faixa de 90,0 a 110,0% (F. BRAS., 2010; USP 33, 2010), as amostras analisadas estariam fora da especificação. Entretanto para isso, estudos adicionais devem ser realizados, a fim de estabelecer um padrão de referência oficial com conteúdo e qualidade assegurada.

ESTUDOS DE ESTABILIDADE

6.8 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Nas últimas décadas a realização de estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos tem recebido especial atenção tanto pelos órgãos reguladores como pelas empresas envolvidas na produção. É responsabilidade do fabricante garantir a segurança e eficácia de seus produtos.

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005). A estabilidade é definida como a capacidade de um produto em manter suas características iniciais, dentro de limites estabelecidos, durante todo período de armazenamento e uso (VADAS, 2000).

Classicamente, a avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos é separada em estudos de estabilidade físico-química e microbiológica. Reconhecer a estabilidade física de uma formulação é importante para o profissional responsável pelo produto e o usuário. O produto farmacêutico deve manter boa aparência; alterações como descoloração ou escurecimento devem ser motivos de desconfiança; o teor de ingrediente ativo deve ser assegurado com o tempo. Para cada forma farmacêutica, há diferentes parâmetros a serem avaliados como propriedades organolépticas, velocidade e volume de sedimentação, consistência, viscosidade, polimorfismo, dureza e desintegração (VADAS, 2000).

A ocorrência de reações químicas pode resultar na degradação de princípios ativos e excipientes. Alterações estruturais do princípio ativo podem reduzir sua atividade e levar a efeitos indesejados, devido à formação de produtos tóxicos. As reações químicas mais comuns são as de oxidação e hidrólise causadas pelo oxigênio e umidade da própria atmosfera. Outras formas de degradação ocorrem por reações fotoquímicas (isomerização, ciclização e fragmentação), racemização e incompatibilidades com outros componentes da fórmula ou embalagem (VADAS, 2000; CORRÊA et al., 2011).

Guias e diretrizes para condução de estudos de estabilidade são disponíveis na literatura, os quais recomendam a realização de duas etapas nos testes de estabilidade: testes acelerados e confirmatórios. Os estudos acelerados são projetados para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser

usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte. Os estudos de longa duração são projetados para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (BRASIL, 2005).

O estudo de estabilidade em condições de estresse pode auxiliar na identificação de prováveis produtos formados e na avaliação da estabilidade intrínseca do fármaco, estabelecendo possíveis rotas de degradação (ICH, 2003). Assim sendo, métodos indicativos de estabilidade são importantes para avaliar o comportamento do fármaco frente a condições extremas de armazenamento, proporcionando a separação e identificação de possíveis produtos de degradação.

Os produtos de degradação podem causar perda de atividade ou mesmo apresentar toxicidade (CARSTENSEN e RHODES, 2000). Segurança e eficácia de produtos farmacêuticos são duas questões fundamentais na terapia farmacológica. A segurança do fármaco é determinada pelo seu perfil fármaco-toxicológico assim como os efeitos adversos causados pelas impurezas na matéria-prima e produto acabado. As impurezas em fármacos frequentemente possuem efeitos farmacológicos ou toxicológicos indesejáveis, os quais inviabilizam o seu uso independente de quão benéficas sejam suas propriedades (RAO e NAGARAJU, 2003).

Atualmente, a grande maioria das determinações de impurezas relacionadas a fármacos é realizada em CLAE, o qual oferece sensibilidade adequada para baixas concentrações e alto grau de automação. Uma ampla variedade de fases estacionárias e modos de operação fazem da CLAE aplicável em todas as classes de fármacos. A maioria dos estudos utiliza separação em fase reversa e detecção no ultravioleta, pois este modo de análise é acessível e oferece melhor confiabilidade, tempo de análise, repetibilidade e sensibilidade, quando comparados a outros sistemas (RAO e NAGARAJU, 2003).

A tendência atual é a utilização de técnicas hifenizadas (GC-MS, LC-MS ou LC-MS-MS, CE-MS, LC-NMR) em vários estágios de desenvolvimento de métodos indicadores de estabilidade. Seu uso é aplicável devido às suas vantagens distintas como versatilidade, sensibilidade, possibilidade de caracterização, análises subestruturais e determinação quantitativa, rápida e seletiva de produtos específicos mesmo em misturas. A única limitação ainda é seu alto custo de instrumentação, pois seu uso não é comum e amplamente difundido como o dos sistemas

simples de cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar ou ressonância magnética nuclear. Essas técnicas sofisticadas estão sendo utilizadas com propósito de monitorar, caracterizar e identificar impurezas, produtos de degradação e metabólitos (BAKSHI e SINGH, 2002).

De acordo com a ANVISA, RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005), o estudo de estabilidade deve ser executado com o produto farmacêutico em sua embalagem primária e a frequência dos testes de doseamento e quantificação de produtos de degradação (quando aplicável) é de 0, 3 e 6 meses para estudo acelerado e 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses para estudo de longa duração. Baseado no exposto, amostras de tige ciclina pó liofilizado em seu frasco-ampola original foram armazenadas em estufa com temperatura controlada (40 °C) por período de 6 meses, sem controle de umidade, uma vez que a resolução não determina a presença de umidade para embalagens impermeáveis e em estufa com temperatura e umidade controlada (30 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ UR) por 9 meses, neste caso a umidade foi aplicada por motivo de disponibilidade de equipamento no laboratório, o qual possuía outros estudos em andamento no mesmo período.

Os estudos de estabilidade aqui realizados não buscaram a determinação da validade do produto, pois este já se encontra no mercado com seu prazo de validade estabelecido. Os objetivos destes estudos foram a avaliação do comportamento das amostras sob condições estressantes através de análises pelos métodos desenvolvidos neste trabalho, observando a possível formação de produtos de degradação e/ou perda de atividade antimicrobiana.

6.8.1 Resultados

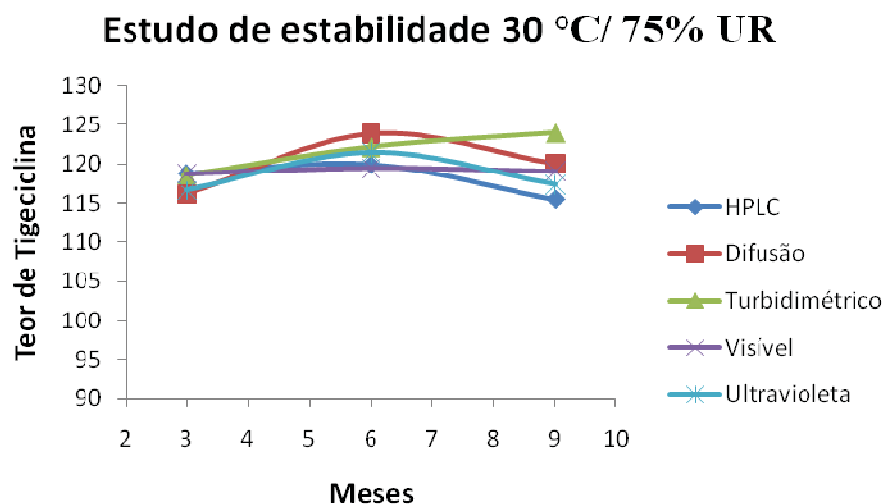
A Tabela 6.8.1 mostra os resultados obtidos nas análises de doseamento das amostras armazenadas em condições de estresse pelos métodos propostos.

Tabela 6.8.1. Valores obtidos na determinação do teor de tigeciclina em pó liofilizado utilizando os métodos propostos

Amostra	Métodos				
	CLAE	Ultravioleta	Visível	Difusão em ágar	Turbidimétrico
Amostra intacta	118,87%	116,84%	117,64%	115,16%	115,67%
40 °C 3 meses	121,33%	117,47%	117,45%	119,37%	122,52%
40 °C 6 meses	120,55%	119,88%	117,50%	121,78%	120,71%
30 °C/ 75% UR 3 meses	118,81%	116,61%	118,79%	116,13%	118,55%
30 °C/ 75%UR 6 meses	119,98%	121,43%	119,43%	123,90%	122,16%
30 °C/ 75% UR 9 meses	115,45%	117,33%	119,05%	120,02%	123,95%

A Figura 6.8.1 mostra o gráfico de teor das amostras de pó liofilizado de tigeciclina, analisadas pelos métodos de CLAE, microbiológicos por difusão em ágar e turbidimetria e espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e visível.

Figura 6.8.1 Análise comparativa de teor das amostras de pó liofilizado de tigeciclina, armazenadas por 9 meses a 30 °C/ 75% UR, analisadas pelos métodos propostos



6.8.2 Discussão

Nos estudos de estabilidade de tigeciclina em pó liofilizado, utilizaram-se os métodos previamente desenvolvidos e validados para acompanhamento de teor das amostras. Ao realizar métodos físico-químicos e microbiológicos paralelamente se obtém uma avaliação completa da qualidade do produto em estudo, uma vez que a ausência de alterações no teor determinado quimicamente não garante a atividade microbiológica do fármaco, pois as medidas químicas são baseadas em regiões cromóforas das moléculas, as quais não estão necessariamente relacionadas à atividade do fármaco.

As amostras submetidas aos estudos de estabilidade foram quantificadas mensalmente e não apresentaram alteração significativa no seu conteúdo. Somente nas análises por CLAE das amostras submetidas a 30 °C/75% UR por 9 meses foi possível detectar decréscimo no conteúdo de fármaco (3,36%). Segundo ICH (2003), é permitida uma diferença de 5% em relação ao teor inicial. Nas análises pelos outros métodos, os resultados foram variáveis não sendo detectado qualquer decréscimo significativo de teor. O método por cromatografia líquida foi aplicado para determinação de teor e verificação de produtos de degradação e o resultado foi o não surgimento de picos adicionais.

ARTIGOS PUBLICADOS

7. ARTIGOS PUBLICADOS

- 1) Silva, L. M.; Salgado, H.R.N. Tigecycline: A review of properties, applications and analytical methods. **Therapeutic Drug Monitoring**, v.32, p.282-288, 2010.
- 2) Silva, L. M.; Almeida, A. E.; Salgado, H.R.N. Thermal analysis and validation of UV and visible spectrophotometric methods for the determination of new antibiotic tigecycline in pharmaceutical product. **Advances in Analytical Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 10-15, 2012.
- 3) Silva, L. M.; Salgado, H.R.N. Validation of a stability-indicating RP-LC method for the determination of tigecycline in lyophilized powder. **Journal of Chromatographic Science**, v. 0, p. 1-8, 2012.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

- ✓ As análises qualitativas permitiram caracterizar o fármaco através de métodos por análise térmica, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria nas regiões do infravermelho, ultravioleta e visível, mostrando-se adequadas para a identificação do fármaco no produto farmacêutico.
- ✓ Os métodos por cromatografia líquida em fase reversa, espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e do visível, sugeridos para análise quantitativa de tigeciclina, demonstraram-se específicos, precisos, exatos e robustos, fornecendo resultados de acordo com os parâmetros preconizados para avaliação de fármacos em produtos farmacêuticos.
- ✓ Os métodos microbiológicos por difusão em ágar e turbidimetria apresentaram parâmetros de validação adequados para determinação de potência de tigeciclina.
- ✓ A comparação dos métodos propostos para determinação quantitativa de tigeciclina em pó liofilizado por CLAE, métodos microbiológicos por difusão em ágar e turbidimetria, espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e visível não apresentou diferença estatisticamente significativa.
- ✓ As amostras de pó liofilizado de tigeciclina mostraram-se estáveis após armazenamento por 6 meses em temperatura de 40 °C e por 9 meses em temperatura de 30 °C/ 75% UR, mostrando que tigeciclina é menos reativa a temperatura do que ao oxigênio.
- ✓ O método por CLAE deve ser adotado associado a um método microbiológico para completa avaliação da qualidade de tigeciclina em pó liofilizado, durante as etapas de produção, controle de qualidade e estudos de estabilidade.
- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho contribuem para realização de novos trabalhos científicos de correlação físico-química e biológica e para aprimorar o controle de qualidade e assim, assegurar a eficácia terapêutica de tigeciclina em pó liofilizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, E.; LIU, L.; DIERICK, K.; GUYOMARD, S.; NABET, P.; RICO, S.; LOUIS, P.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Neomycin: microbiological assay or liquid chromatography? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 757-766, 1998.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BEDREGAL, P.; TORRES, B.; UBILLÚS, M.; MENDONZA, P.; MONTOYA, E. Robustness in NAA evaluated by the Youden and Steiner test. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 278, n. 3, p. 801-806, 2008.

BERGERON, J.; AMMIRATI, M.; DANLEY, D. Glycylcyclines bind to the high affinity tetracycline ribosomal binding site and evade Tet(M)- and Tet(O)-mediated ribosomal protection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2226-2228, 1996.

BHATTACHARYA, M.; PARAKH, A.; NARANG, M. Tigecycline. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 55, n.1, p. 65-68, 2009.

BIEDENBACH, D.J.; BEACH, M.L.; JONES, R.N. In vitro antimicrobial activity of GAR-936 tested against antibiotic-resistant gram-positive blood stream infection isolates and strains producing extended-spectrum beta-lactamases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 40, p. 173-177, 2001.

BONFILIO, R.; CAZEDEY, E.C.L.; ARAÚJO, M.B.; SALGADO, H.R.N. Analytical validation of quantitative high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis: A practical approach. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, p. 87-100, 2012.

BOUCHER, H.W.; WENNERSTEN, C.B.; ELIOPOULOS, G.M. In vitro activities of the glycylcycline GAR-936 against gram positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 8, p. 2225-2229, 2000.

BRADFORD, P.A. Tigecycline: A first in class glycylcycline. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.26, n. 21, p. 163-168, 2004.

BRADFORD, P.A.; WEAVER-SANDS, D.T.; PETERSEN, P.J. In vitro activity of tigecycline against isolates from patients enrolled in phase 3 clinical trials of treatment for complicated skin

and skin-structure infections and complicated intra-abdominal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, S. 5, p. S315-S332, 2005a.

BRADFORD, P.A.; PETERSEN, P.J.; YOUNG, M.; JONES, C.H.; TISCHLER, M.; O'CONNELL, J. Tigecycline MIC testing by broth dilution requires use of fresh medium or addition of the biocatalytic oxygen-reducing reagent oxyrase to standardize the test method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3903-3909, 2005b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização de estudo de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.

BREEDT, J.; TERAS, J.; GARDOVSKIS, J.; MARITZ, F.J.; VAASNA, T.; ROSS, D.P.; GIOUD-PAQUET, M.; DARTOIS, N.; ELLIS-GROSSE, E.J.; LOH, E., for the Tigecycline 305 cSSSI Study Group. Safety and efficacy of tigecycline in treatment of skin and skin structure infections: results of a double-blind phase 3 comparison study with vancomycin-aztreonam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4658-4666, 2005.

BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationery Office, 2010. p. 1403 e 2018.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil, 2006.

CARSTENSEN, J.T.; RHODES, C.T. **Drug stability – Principle and practices**. 3 ed. New York: Marcel Denker, 2000.

CASAL, M.; RODRÍGUEZ, F.; JOHNSON, B.; GARDUNO, E.; TUBAU, F.; ORTIZ DE LEJARAZU, R.; TENORIO, A.; GIMÉNEZ, M. J.; BARTOLOMÉ, R.; GARCIA-REY, C.; AGUILAR, L.; GARCÍA-ESCRIBANO, N. Influence of testing methodology on the tigecycline activity profile against presumably tigecycline-non-susceptible *Acinetobacter* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 69–72, 2009.

CESAR, I.C.; PIANETTI, G.A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n. 2, p. 235-240, 2009.

CHAN, C.C. Principles and practices of analytical method validation: validation of analytical methods is time-consuming but essential. **The Quality Assurance Journal**, v. 14, n. 3-4, p. 61-64, 2011.

CHARTONE-SOUZA, E.; LOYOLA, T.L.; BUCCIARELLI-RODRIGUEZ, M.; MENEZES, M. A.; REY, N.A.; PEREIRA-MAIA, E.C. Synthesis and characterization of a tetracycline–platinum (II) complex active against resistant bacteria. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 1001-1008, 2005.

CHOPRA, I. Glycylcyclines: third-generation tetracycline antibiotics. **Current Opinion in Pharmacology**, v.1, p. 464-469, 2001.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

CHOPRA, I. New developments in tetracycline antibiotics: Glycylcyclines and tetracyclines efflux pump inhibitors. **Drug Resistance Updates**, v. 5, p. 119-125, 2002.

CLASS, S.D.; DALTON, C.R.; HANCOCK, B.C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Focus**, v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.

CONTE Jr, J.E.; GOLDEN, J.A.; KELLY, M.G.; ZURLINDEN, E. Steady-state serum and intrapulmonary pharmacokinetics and pharmacodynamics of tigecycline. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 523-529, 2005.

CORRÊA, J.C.R.; REICHMAN, C.; SOARES, C.D.V.; SALGADO, H.R.N. Stability study of fluconazole applying validated bioassay and stability- indicating LC methods. **Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques**, v. 2, n. 5, p. 126-131, 2011.

COUTO, C.M.C.M.; LIMA, J.L.F.C.; CONCEIÇÃO, M.; MONTENEGRO, B.S.M.; REIS, S. Tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline determination by flow injection potentiometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.18, p. 527-533, 1998.

CRAIG, D.Q.M.; READING, M. **Thermal Analysis of Pharmaceuticals**. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2007.

DOAN, T.; FUNG, H.B.; MEHTA, D.; RISK, P.F. Tigecycline: A glycycline antimicrobial agent. **Clinical Therapeutics**, v. 28, n. 8, p. 1079-1106, 2006.

DOERN, G. V.; HEILMANN, K. P.; HUYNH, H. K.; RHOMBERG, P. R.; COFFMAN, S. L.; BRUEGGEMANN, A. B. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999-2000, including a comparison of resistance rates since 1994-1995. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 46, p. 1721-1729, 2001.

DUARTE, H.A.; CARVALHO, S.; PANIAGO, E.B.; SIMAS, A.M. Importance of tautomers in the chemical behavior of tetracyclines. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 1, p. 111-120, 1999.

ELLIS-GROSSE, E.J. ; BABINCHAK, T.; DARTOIS, N. ; ROSE, G.; LOH, E., for the Tigecycline 300 and 305 cSSSI Study Groups. The efficacy and safety of tigecycline in the treatment of skin and skin-structure infections: results of 2 double-blind phase 3 comparison studies with vancomycin-aztreonam. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, sup. 5, p. S341-S353, 2005.

ENTENZA, J.M.; MOREILLON, P. Tigecycline in combination with other antimicrobial: a review of in vitro, animal and case report studies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 8.e1-8.e9, 2009.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I. An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p.755-767, 2001.

FAHELELBOM, K.M.S. Analysis of certain tetracyclines and oxytetracyclines through charge transfer complexation. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 3, n. 3, p. 212-218, 2008.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. 2010. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm. Acesso em: 03 julho 2012.

FERNÁNDEZ-MAZARRASA, C.; MAZARRASA, O.; CALVO, J.; DEL ARCO, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. High concentrations of manganese in Mueller-Hinton agar increase MICs of tigecycline determined by Etest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 827-829, 2009.

FOMIN, P.; BEURAN, M.; GRADAUSKAS, A.; BARAUSKAS, G.; DATSENKO, A.; DARTOIS, N.; ELLIS-GROSSE, E.; LOH, E., on behalf of the 306 Study Group. Tigecycline is

efficacious in the treatment of complicated intra-abdominal infections. **International Journal of Surgery**, v.3, p. 35-47, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Validation of chromatographic methods**. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 1994.

FRITSCH, T.R.; KIRBY, J.T.; JONES, R.N. In vitro activity of tigecycline (GAR-936) tested against 11,859 recent clinical isolates associated with community-acquired respiratory tract and Gram-positive cutaneous infections. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 49, p. 201–209, 2004.

GALES, AC.; JONES, R.N. Antimicrobial activity and spectrum of the new glycylcycline, GAR-936 tested against 1,203 recent clinical bacterial isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 36, p. 19-36, 2000.

GARRISON, M. W.; NEUMILLER, J. J.; SETTER, S. M. Tigecycline: an investigational glycylcycline antimicrobial with activity against resistant Gram-positive organisms. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 12-22, 2005.

GRAHAM, P.L. **Pharmaceutical Chemistry - An Introduction to Medicinal Chemistry**, British Library, 1995. p.201-202.

HAECKEL, R.; SONNTAG, O. Validation of quantitative analytical procedures in laboratory Medicine. **Journal of Laboratory Medicine**, v. 36, n. 2, p. 111-118, 2012.

HATAKEYAMA, T.; QUINN, F.X. **Thermal analysis: fundamentals and applications to polymer**. New York: John Wiley & Chichester, 1994. p. 89-92.

HEWITT, W. **Microbiological assay**. New York: Academic Press, 1977. p. 41-42.

HOFFMANN, M.; DeMAIO, W.; JORDAN, R. A.; TALAAT, R.; HARPER, D.; SPETH, J.; SCATINA, J. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of [C^{14}] tigecycline, a first-in-class glycylcycline antibiotic, after intravenous infusion to healthy male subjects. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 9, p. 1543-1553, 2007.

HOPE, R.; WARNER, M.; MUSHTAQ, S.; WARD, M.E.; PARSONS, T.; LIVERMORE, D.M. Effect of medium type, age and aeration on the MICs of tigecycline and classical tetracyclines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 1042-1046, 2005.

HYLANDS, J. Tigecycline: A new antibiotic. **Intensive and Critical Care Nursing**, v. 24, p. 260-263, 2008.

ICH – International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)**. ICH Steering Committee, Switzerland, 2003.

ICH – International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1)**. ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

JESOWSKA-BOJCZUK, M.; LAMBS, KOZLOWSKI, H.; BERTHON, G. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. 10. Structural investigations on copper (II) complexes of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, 4-(dimethylamino) tetracycline, and 6-desoxy-6-demethyltetracycline and discussion of their binding modes. **Inorganic Chemistry**, v. 32, p. 428-437, 1993.

JI, A.J.; SAUNDERS, J.P.; WADGAONKAR, N.D.; PETERSEN, P.J.; O'LEARY, K.; MCWILLIAMS, W.E.; AMORUSI, P.; LEAL, M.; FLUHLER, E.N. A novel antibiotic bone assay by liquid chromatography/tandem mass spectrometry for quantitation of tigecycline in rat bone. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 970-979, 2007.

JI, A. J.; SAUNDERS, J. P.; AMORUSI, P.; WADGAONKAR, N. D.; O'LEARY, K.; LEAL, M.; DUKART, G.; MARSHALL, B.; FLUHLER, E. N. A sensitive human bone assay for quantitation of tigecycline using LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 866-875, 2008.

JI, A. J.; SAUNDERS, J. P.; AMORUSI, P.; STEIN, G.; WADGAONKAR, N. D.; O'LEARY, K.; LEAL, M.; FLUHLER, E. N. A sensitive human bone assay for quantitation of tigecycline using LC/MS/MS. **Bioanalysis**, v. 2, n. 1, p. 81-94, 2010.

JOHNSON, A.P.; LIVERMORE, D.M.; TILLOTSON, G.S. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria: what's current, what's anticipated? **Journal of Hospital Infection**, v. 49, Suppl. A, p. S3-S11, 2001.

JONES, R. N. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. **Chest**, v. 119, p. S397-S404, 2001.

KASBEKAR, N. Tigecycline: a new glycylcycline antimicrobial agent. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 63, n. 13, p. 1235-1243, 2006.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **CLAE for Pharmaceutical Scientists**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. p. 3, 11, 12.

KUMAR, R.S.; MANJUNATHA, D.H.; SHAIKH, S.M.T.; SEETHARAMAPPA, J.; HARIKRISHNA, K. Sensitive extractive spectrophotometric methods for the determination of trazodone hydrochloride in pharmaceutical formulations. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n.7, p. 968-971, 2006.

LAPLANTE, K.L.; RYBAK, M.J.; LEUTHNER, K.D.; CHIN, J.N. Impact of *Enterococcus faecalis* on the bactericidal activities of arbekacin, daptomycin, linezolid, and tigecycline against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a mixed-pathogen pharmacodynamic model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p.1298-1303, 2006.

LEVY, S.B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p.S122-S129, 2004.

LI, C.; SUTHERLAND, C.A.; NIGHTINGALE, C.H.; NICOLAU, D.P. Quantitation of tigecycline, a novel glycylcycline, by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 811, p. 225-229, 2004.

LIAO, C.; KUNG, H.; HSU, G.; LU, P.; LIU, Y.; CHEN, C.; LEE, C.; SUN, W.; JANG, T.; CHIANG, P.; CHENG, Y.; LIN, H.; SHI, Z.; WANG, L.; CHUANG, Y.; TSAO, S.; LU, C.; LIU, J.; HUANG, C.; HSUEH, P. In-vitro activity of tigecycline against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Taiwan determined by the broth microdilution and disk diffusion methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, sup. 3, p. S192-S196, 2008.

LIARUANGRATH, S.; LIARUANGRATH, B.; WATANESK, S.; RUENGSIAGOON, W. Flow injection spectrophotometric determination of tetracycline in a pharmaceutical preparation by complexation with aluminium (III). **Analytical Sciences**, v. 22, p. 15-19, 2006.

LIVERMORE, D.M. Tigecycline: What is it, and where should it be used? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p. 611-614, 2005.

LOPES, H. V. Tigeciclina: nova arma antibacteriana. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.8, n.1, p. 45-46, 2006.

LOPES, C.C.G.O.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a stability-indicative agar diffusion assay to determine the potency of linezolid in tablets in the presence of photodegradation products. **Talanta**, v. 82, n. 3, p. 918-922.

MACGOWAN, A.P. Tigecycline pharmacokinetic/pharmacodynamic update. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, sup. 1, p. i11-i16, 2008.

MAGNAM, J.; BARTHES, D.; GIRAUD, J.J. Complexes of tetracyclines. Study of 1:1 complexes of iron (III), cobalt (II), copper (II) and nickel (II) with tetracycline, oxytetracycline, demeclocycline, doxycycline and minocycline. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 42, n. 2, p. 155-159, 1984.

MEAGHER, A.K.; AMBROSE, P.G.; GRASELA, T.H.; ELLIS-GROSSE, E.J. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile for tigecycline – a new glycylcycline antimicrobial agent. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, n. 3, p.165-171, 2005.

MENDEZ, A.S.L.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Validation of CLAE and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 947-954, 2003.

MEYER, V.R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 15. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2010. p.17.

MRUTYUNJAYA RAO, R. **Visible spectrophotometry as a tool for the assay of selected drugs**. 2008. Tese (Philosophy in Chemistry) - Andhra University, Visakhapatnam, India, 2008. Disponível em: <http://knol.google.com/k/dr-r-mrutyunjaya-rao/visible-spectrophotometry-as-a-tool-for/2a83s15sesheq/1>. Acesso em: 06 abril 2011.

MURALIDHARAN, G.; MICALIZZI, M.; SPETH, J.; RAIBLE, D.; TROY, S. Pharmacokinetics of tigecycline after single and multiple doses in healthy subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 220-229, 2005.

NATHWANI, D. New antibiotics for the management of complicated skin and soft tissue infections: are they any better? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, sup.1, p. S24–S29, 2009.

NOSKIN, G.A. Tigecycline a new glycylcycline for treatment of serious infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, sup. 5, p. S303-S314, 2005.

NOVÁKOVÁ, L.; SANTÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. CLAE methods for the determination of simvastatin and atorvastatin. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 352-367, 2008.

OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 109-133, 2000.

OLIVA, M.E.; REKHA, A.; YELLIN, A.; PASTERNAK, J.; CAMPOS, M.; ROSE, G.M.; BABINCHAK, T.; ELLIS-GROSSE, E.J.; LOH, E.; 301 Study Group. A multicenter trial of the efficacy and safety of tigecycline versus imipenem/cilastatin in patients with complicated intra-abdominal infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, n. 88, 2005.

O'NEIL, M.J. (Ed.). **The Merck index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 14th. ed. Whitehouse Station, New Jersey: Merck & Co., 2006.

PATEL, R.; ROUSE, M.S.; PIPER, K.E.; STECKELBERG, J.M. In vitro activity of GAR-936 against vancomycin-resistant enterococci, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, p.177-179, 2000.

PATERSON, D.L. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, p. 460-463, 2000.

PEREIRA-MAIA, E.C.; SILVA, P.P.; ALMEIDA, W.B.; SANTOS, H.F.; MARCIAL, B.L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Tetraciclina e glicilciclina: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

PETERSEN, P.J.; BRADFORD, P.A. Effect of medium age and supplementation with the biocatalytic oxygen-reducing reagent oxyrase on in vitro activities of tigecycline against recent clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3910-3918, 2005.

PETERSEN, P.J.; LABTHAVIKUL, P.; JONES, C.H.; BRADFORD, P.A. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 573-576, 2006.

PETERSON, L.R. A review of tigecycline - the first glycylcycline. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.32, sup. 4, p. S215-S222, 2008.

PILLAR, C.M.; DRAGHI, D.C.; DOWZICKY, M.J.; SAHM, D.F. In vitro activity of tigecycline against gram-positive and gram-negative pathogens as evaluated by broth microdilution and etest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 9, p. 2862–2867, 2008.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2010.

PITKIN, D.; ACTOR, P.; HOLL, W.; POST, A.; WEISBACH, J.A. Semiautomated turbidimetric microbiological assay for determination of cefazolin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 5, n. 3, p. 223-227, 1974.

POSTIER, R.G.; GREEN, S.L.; KLEIN, S.R.; ELLIS-GROSSE, E.J.; LOH, E. Results of a multicenter, randomized, open-label efficacy and safety study of two doses of tigecycline for complicated skin and skin-structure infections in hospitalized patients. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 5, p. 704-714, 2004.

RAMPHAL, R.; AMBROSE, P.G. Extended-spectrum beta-lactamases and clinical outcomes: current data. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, sup. 4, p. 164-172, 2006.

RAO, R.N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of CLAE methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 335- 377, 2003.

RAO, R.N.; MEENA, S.; RAO, A.R. An overview of the recent developments in analytical methodologies for determination of COX-2 inhibitors in bulk drugs, pharmaceuticals and biological matrices. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3-4, p. 349-363, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v.27, n.5, p.807-812, 2004.

RODVOLD, K.A.; GOTFRIED, M.H.; CWIK, M.; KORTH-BRADLEY, J.M.; DUKART, G.; ELLIS-GROSSE, E.J. Serum, tissue and body fluid concentrations of tigecycline after a single 100 mg dose. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 1221-1229, 2006.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. Overview of tigecycline and its role in the era of antibiotic resistance. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 203-216, 2006.

RUENGSIAGOON, W. A rapid flow injection spectrophotometric analysis for tetracycline chlortetracycline or oxytetracycline. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 16, n. 6, p. 16-21, 2008.

SACCHIDANAND, S.; PENN, R.L.; EMBIL, J.M.; CAMPOS, M.E.; CURCIO, D.; ELLIS-GROSSE, E.; LOH, E.; ROSE, G. Efficacy and safety of tigecycline monotherapy compared with vancomycin plus aztreonam in patients with complicated skin and skin structure infections: Results from a phase 3, randomized, double-blind trial. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 9, p. 251-261, 2005.

SAHA, U. Colorimetric determination of tetracycline derivatives in pharmaceutical preparations. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 2, p. 242-244, 1989.

SAHA, U.; SEN, A.K.; DAS, T.K.; BHOWAL, S.K. Spectrophotometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations, with uranyl acetate. **Talanta**, v.37, n. 12, p. 1193-1196, 1990.

SALVATORE, C.M.; TECHASAENSIRI, C.; TAGLIABUE, C.; KATZ, K.; LEOS, N.; GOMEZ, A.M.; MCCracken, G.H.; HARDY, R.D. Tigecycline therapy significantly reduces the concentrations of inflammatory pulmonary cytokines and chemokines in a murine model of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1546-1551, 2009.

SCHLUTER, H. Reversed-Phase Chromatography. In: KASTNER, M. **Journal of Chromatography Library** (v. 61) -**Protein Liquid Chromatography**. Amsterdam: Elsevier Science B.V, 1999. p. 147.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis, understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n.1, p. 57-66, 2003.

SHABIR, G.A.; LOUGH, W.J.; ARAIN, S.A.; BRADSHAW, T.K. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 311-333, 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

STEIN, G. E.; CRAIG, W. A. Tigecycline: A critical analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 518-524, 2006.

SULTAN, S.M.; ALZAMIL, I.Z.; ALARFAJ, N.A. Complexometric-spectrophotometric assay of tetracyclines in drug formulations. **Talanta**, v. 35, n. 5, p. 375-378, 1988.

SUN, H.K.; ONG, C.T.; UMER, A.; HARPER, D.; TROY, S.; NIGHTINGALE, C.H.; NICOLAU, D.P. Pharmacokinetic profile of tigecycline in serum and skin blister fluid of healthy subjects after multiple intravenous administrations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1629-1632, 2005.

SUNARIC, S.M.; MITIC, S.S.; MILETIC, G.Z.; PAVLOVIC, A.N.; NASKOVIC-DJOKIC, D. Determination of doxycycline in pharmaceuticals based on its degradation by Cu(II)/H₂O₂ reagent in aqueous solution. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 231-237, 2009.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 12-20, 1998.

TOWNSEND, M.L.; POUND, M.W.; DREW, R.H. Tigecycline: a new glycycline antimicrobial. **International Journal of Clinical Practice**, v. 60, n. 12, p. 1662-1672, 2006.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 33 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2010.

VADAS, E.B. Stability of pharmaceutical products. In: GENARO, A.R. Remington's: **The science and practice of pharmacy**. 20. ed. Easton: Mack Publishing Company, 2000. p. 986-994.

VOLKERS, J.; PALM, G.J.; WEISS, M.S. WRIGHT, G.D.; HINRICHS, W. Structural basis for a new tetracycline resistance mechanism relying on the TetX monooxygenase. **FEBS Letters**, v. 585, p. 1061-1066, 2011.

WESSELS, J.M.; FORD, W.E.; SZYMCAK, W.; SCHNEIDER, S. The complexation of tetracycline and anhydrotetracycline with Mg^{2+} and Ca^{2+} : A spectroscopic study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, p. 9323-9331, 1998.

WHITTEM, T.; GAON, D. Principles of Antimicrobial Therapy. **Veterinary Clinics North America: Small Animal Practice**, v.28, n.8, p.197-214, 1998.

WILCOX, M.H. The tide of antimicrobial resistance and selection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, suppl. 3, p. S6-S10, 2009.

ZARBIELLI, M.G.; MACEDO, S.M.D.; MENDEZ, A.S.L. Controle de qualidade de cápsulas de piroxicam manipuladas em farmácias do município de Erechim – RS. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 2, p. 55-59, 2006.

ZHANEL, G.G.; HOMENUIK, K.; NICHOL, K.; NOREDDIN, A.; VERCAIGNE, L.; EMBIL, J.; GIN, A.; KARLOWSKY, J.A.; HOBAN, D.J. The glycyclines: a comparative review with the tetracyclines. **Drugs**, v. 64, n. 1, p.63-88, 2004.

ZORPAS, K.M.; VALSAMI, G.M.; VRYONIS, E.V.; SKOUTELIS, A.T.; ARCHONTAKI, H.A. Robust and sensitive high-performance liquid chromatographic-UV detection technique for the determination of tigecycline in rabbit plasma. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 3, p. 847-856, 2011.