

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ELIANE GANDOLPHO TÓTOLI BELAVENUTO

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA E ESTUDOS
MICROBIOLÓGICO E DE ESTABILIDADE DE PREPARAÇÕES
INJETÁVEIS DE DAPTOMICINA

Processo FAPESP nº 2013/02349-0
Processo FAPESP (BEPE) nº 2014/21947-9

ARARAQUARA-SP
2016

ELIANE GANDOLPHO TÓTOLI BELAVENUTO

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA E ESTUDOS
MICROBIOLÓGICO E DE ESTABILIDADE DE PREPARAÇÕES
INJETÁVEIS DE DAPTOMICINA**

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: Prof^a. Dr^a. Hérica Regina Nunes Salgado

Coorientador: Prof. Dr. Sanjay Garg (*University of South Australia* - UniSA)

ARARAQUARA-SP

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

B426a Belavenuto, Eliane Gandolpho Tótolli
Análise químico-farmacêutica e estudos microbiológico e de estabilidade de preparações
injetáveis de daptomicina / Eliane Gandolpho Tótolli Belavenuto. – Araraquara, 2016.
302 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas, área Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Hérica Regina Nunes Salgado.

Coorientador: Sanjay Garg (*University of South Australia* - UniSA)

1. Daptomicina - Métodos analíticos. 2. CLAE. 3. Eletroforese capilar. 4. Espectrofotometria.
5. Método turbidimétrico. 6. Estudo microbiológico. 7. Estabilidade. 8. Sinergia. I. Salgado,
Hérica Regina Nunes, orient. II. Garg, Sanjay, coorient. III. Título.

CAPES: 40500005

ELIANE GANDOLPHO TÓTOLI BELAVENUTO

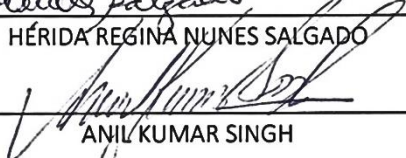
ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA E ESTUDOS MICROBIOLÓGICO E DE
ESTABILIDADE DE PREPARAÇÕES INJETÁVEIS DE DAPTOMICINA

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual
Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como
requisito para a obtenção do título de Doutor(a) em
Ciências Farmacêuticas

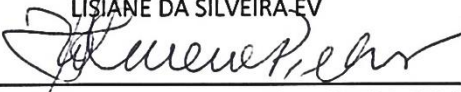
Araraquara, 29 de Setembro de 2016

BANCA EXAMINADORA


HÉRICA REGINA NUNES SALGADO


ANIL KUMAR SINGH


LISIANE DA SILVEIRA-EV


ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO


MARLUS CHORILLI

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Luiz
e Luiza, ao meu amado marido, Ricardo, e ao
meu irmão, Márcio, os maiores incentivadores
que tenho na vida.

AGRADECIMENTOS

É com enorme carinho que agradeço, sinceramente, a todos que contribuíram direta ou indiretamente com a elaboração deste trabalho:

Primeiramente, agradeço a Deus, por me dar coragem, perseverança e capacidade para a realização deste trabalho.

Agradeço profundamente aos meus amados pais, Luiz Ronaldo Tótolli e Luiza Gandolpho Tótolli, por tornarem minha caminhada até aqui possível. Sem seu apoio e incentivo esta conquista não seria possível.

Ao meu amado marido, Ricardo Braga Belavenuto, tenho muito a agradecer por todo o incentivo, conselhos sensatos, companheirismo, amizade e paciência. Amo você! Obrigada por tudo!

Ao meu querido irmão, Márcio Gandolfo Tótolli, agradeço a amizade, o carinho e o incentivo de sempre.

À minha amada avó, Nair Marangoni Gandolfo, pela dedicação, carinho e incentivo.

A todos os meus tios e primos, pela amizade, incentivo e carinho, especialmente à minha madrinha Marli Gandolfo.

Aos meus queridos sogros, Maria Izabel Braga Belavenuto e Henrique Belavenuto Neto, e à minha querida cunhada, Camila Braga Belavenuto, pelo apoio e carinho.

À minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a. Hérica Regina Nunes Salgado, pela oportunidade de realizar um projeto tão especial, além da amizade, motivação, confiança, apoio emocional, paciência e dedicação. A você, minha profunda admiração e gratidão!

Ao meu co-orientador, Prof. Sanjay Garg, e sua excelente equipe, por terem gentilmente me recebido em seu laboratório na *University of South Australia* (UniSA) e terem compartilhado comigo conhecimento e bons momentos. Foi um prazer trabalhar com esta equipe!

Ao Prof. Darren Trott, da *University of Adelaide*, e sua equipe, pelo auxílio no estudo microbiológico. Gostaria de deixar um agradecimento especial ao Dr. Abiodun Ogunniyi e

Dr. Manouchehr Khazandi, da mesma equipe, por toda dedicação, ajuda e amizade durante o período do meu estágio de pesquisa na UniSA.

À *University of South Australia* e seus colaboradores, pela oportunidade de realizar meu estágio de pesquisa e por terem me dado todo o suporte necessário para que eu tivesse um período muito produtivo em Adelaide.

À Prof^a. Dr^a. Cristiane Masetto de Gaitani, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, e sua competente equipe, por terem aberto as portas de seu laboratório para que eu desenvolvesse o método de eletroforese capilar. Também gostaria de agradecer à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP pela oportunidade.

Ao Laboratório NUBB 2, do Instituto de Química da UNESP, Araraquara, gostaria de agradecer pela oportunidade de realizar parte de meus experimentos cromatográficos.

À querida Prof^a. Tais Maria Bauab, agradeço por ter me recebido com tanto carinho em seu laboratório para a realização de parte dos estudos microbiológicos. Também gostaria de agradecer a todos os seus alunos, especialmente ao Matheus Aparecido dos Santos Ramos, pela ajuda.

Também tenho o prazer de agradecer aos meus queridos amigos e colegas da FCFar-UNESP, em especial à Tahisa Marcela Pedroso, Danilo Fernando Rodrigues, Ana Carolina Kogawa, Felipe Hugo Alencar Fernandes, Caroline Magnani Spagnol, Lívia Paganini Consortti, Rúbia Sversut, Josilene Chaves Ruela Corrêa, Flávia Fiorentino, Lucélia Magalhães da Silva, Bianca Aparecida de Marco e Mariana Teixeira da Trindade, que estiveram sempre ao meu lado durante a realização deste trabalho, me ajudando, apoiando, trocando conhecimentos e alegrias! Obrigada por tudo!

Agradeço à Maria de Fátima Rodrigues Moreti, pela amizade de tantos anos e por toda dedicação e exemplo de profissionalismo! Obrigada por cuidar tão bem de todos nós no laboratório! Aprendi muito com você!

Agradeço também a todos os estagiários que me ajudaram (e muito!) durante a fase prática deste trabalho. Meu agradecimento especial à Jéssica Sayuri Hisano Natori e à Stefany Fanelli. Fiquei muito honrada por ter contribuído com a formação de vocês! Muito obrigada por toda a ajuda e amizade!

À Prof^a. Dr^a. Maria Virgínia Costa Scarpa, por abrir as portas de seu laboratório, contribuindo com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca do exame de qualificação, Prof^a. Dr^a. Cristiane Masetto de Gaitani, da FCFRP-USP, e Prof^a. Dr^a. Tais Maria Bauab, da FCFar-UNESP, pela disponibilidade e colaboração para tornar este trabalho melhor.

Aos membros da banca da defesa, Prof^a. Dr^a. Lisiane da Silveira Ev, da UFOP, Prof. Dr. Anil Kumar Singh, da FCF-USP, Prof^a. Dr^a. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, da FCFar-UNESP, e Prof. Dr. Marlus Chorilli, da FCFar-UNESP, pela contribuição com sugestões valiosas para o enriquecimento deste trabalho.

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

A todos os professores do Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), pela formação sólida e de qualidade.

Às funcionárias da seção de Pós-graduação, pelos esclarecimentos necessários.

Aos funcionários da biblioteca da FCFar-UNESP, por toda ajuda.

Às funcionárias da limpeza, pela dedicação e por nos proporcionar um ambiente de trabalho confortável e agradável.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), agradeço o apoio financeiro concedido no início do meu curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), agradeço às bolsas concedidas (Processo nº 2013/02349-0 e BEPE Processo nº 2014/21947-9).

RESUMO

A daptomicina é o primeiro membro aprovado de uma nova classe de antimicrobianos, a dos lipopeptídeos cíclicos, e apresenta ação seletiva contra bactérias Gram-positivas, incluindo cepas resistentes à meticilina e à vancomicina. É distribuída comercialmente como Cubicin[®], na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável. Por ser um medicamento de recente inserção no mercado mundial, existem poucos estudos na literatura em relação ao desenvolvimento de metodologias analíticas e estudo de estabilidade aplicados a este lipopeptídeo cíclico. Desta forma, pesquisas nesta área são de fundamental importância e altamente relevantes para otimizar sua análise na indústria e garantir a qualidade do produto já comercializado. Este trabalho desenvolveu e validou métodos analíticos para análise qualitativa e quantitativa de daptomicina em pó liofilizado, bem como estudos de estabilidade e microbiológico. Em relação à análise qualitativa, a daptomicina foi analisada quanto às suas características físicas e ponto de fusão. Também foram desenvolvidos métodos por cromatografia em camada delgada (CCD) indicativo de estabilidade, espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar (EC) e espectrofotometria na região do infravermelho (IR) médio, possibilitando a identificação da amostra. Para quantificação do fármaco, foram validados os métodos de espectrofotometria na região do UV, ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico, CLAE, EC e espectrofotometria na região do IR médio. O método espectrofotométrico na região do UV foi desenvolvido em 221 nm, com faixa de linearidade de 6,0 a 21,0 µg/mL, utilizando água como solvente. O ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico utilizou o micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 IAL 2082, com faixa linear de 8,0-18,0 µg/mL. O método por CLAE utilizou comprimento de onda de detecção de 221 nm, fase móvel composta por água e etanol (45:55, v/v), com pH ajustado para 4,5 com ácido acético glacial, obtendo-se um tempo de retenção médio de 5,7 minutos e capacidade de separação de produtos de degradação. A faixa linear avaliada foi de 20 a 70 µg/mL. O método de EC foi validado em 200 nm, com eletrólito de corrida composto por solução tampão fosfato de potássio (15 mM) pH 7,0, obtendo-se um tempo de migração médio de 1,7 minutos e capacidade de separar produtos de degradação. A faixa linear foi de 50,0 a 175,0 µg/mL. A espectrofotometria na região do IR médio foi desenvolvida na faixa espectral de 1700 a 1600 cm⁻¹. A faixa linear foi de 0,2 a 0,6 mg/150 mg. Os métodos desenvolvidos destacam-se por não utilizarem solventes orgânicos em suas análises, enquadrando-se nos parâmetros da Química Verde. Estudos de estabilidade da daptomicina também foram realizados. O produto farmacêutico apresentou boa estabilidade nas condições aceleradas (25 °C ± 2 °C/ UR 60% ± 5%) e de longa duração estudadas (5 °C ± 3 °C). A daptomicina na forma pura mostrou-se instável em condições alcalinas, ácidas e oxidativas. No estudo microbiológico, a daptomicina demonstrou ser muito ativa contra cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina, *S. pneumoniae* e enterococos resistentes à vancomicina. No entanto, 15% das cepas de *S. aureus* sensíveis à meticilina mostraram-se resistentes. Quanto aos estudos de sinergia, combinações entre daptomicina + LP9666 e daptomicina + NCL são promissoras e merecem um estudo mais aprofundado. Os métodos desenvolvidos neste trabalho contribuem para avaliação da qualidade, segurança e eficácia terapêutica de daptomicina em pó liofilizado, além de ampliar os conhecimentos científicos relacionados a este novo antimicrobiano.

Palavras-chave: CLAE. Controle de qualidade. Daptomicina. Eletroforese capilar. Espectrofotometria. Estabilidade. Estudo microbiológico. Método turbidimétrico. Métodos analíticos. Sinergia.

ABSTRACT

Daptomycin is the first approved member from a new class of antimicrobial agents, the cyclic lipopeptides, and presents selective action against Gram-positive bacteria, including methicillin and vancomycin resistant strains. This antimicrobial agent is commercially distributed in lyophilized powder as CubicinTM. Since daptomycin is a new drug in the market, there are few studies in the literature regarding the development of analytical methodologies and stability studies applied to this cyclic lipopeptide. In this way, researches in this area are essential and highly relevant to optimize the analysis of this drug in the industry and ensure the quality of the marketed product. This work developed and validated analytical methods for qualitative and quantitative analysis of daptomycin in pharmaceutical formulation and its stability and microbiological studies. Regarding the qualitative analysis, the physical characteristics and melting point of daptomycin were studied. The following qualitative methods were also performed: thin layer chromatography, spectrophotometry in ultraviolet (UV) region, high performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE) and spectrophotometry in medium infrared (IR) region, which allowed the daptomycin identification. For the quantitative analysis, the following methods were developed and validated: spectrophotometry in the UV region, microbiological method by turbidimetric assay, HPLC, CE and spectrophotometry in medium infrared (IR) region. The UV spectrophotometric method was developed in a wavelength of 221 nm, with concentration linear range from 6.0 to 21.0 µg/mL, using the water as solvent. The microbiological method employed *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 IAL 2082 as the microorganism-test, and presented a concentration linear range from 8.0 to 18.0 µg/mL. The HPLC method used detection wavelength of 221 nm and mobile phase consisted of water and ethanol (45:55, v/v) with the pH adjusted to 4.5 with glacial acetic acid, obtaining a retention time of 5.7 minutes. This method also showed its stability-indicating ability. The evaluated linear range was from 20.0 to 70.0 µg/mL. The CE method was performed at 200 nm with an electrolite consisting of potassium phosphate buffer solution (15 mM), pH 7.0, yielding an average migration time of 1.7 minutes and ability to separate degradation products. The IR spectrophotometry was carried out in the spectral range from 1700 to 1600 cm⁻¹. The linear range was from 0.2 to 0.6 mg/150 mg. The developed methods stand out for not using organic solvents in their analysis, fitting the parameters of Green Chemistry. Stability studies of daptomycin in lyophilized powder and in the pure form were conducted. The pharmaceutical product showed to be stable under the accelerated (25 °C ± 2 °C/ UR 60% ± 5%) and long term (5 °C ± 3 °C) studied conditions. On the other hand, daptomycin in pure form proved to be unstable in alkaline, acidic and oxidative conditions. Microbiological studies of daptomycin were also performed and daptomycin showed to be very active against strains of methicillin-resistant *S. aureus*, *S. pneumoniae*, and vancomycin-resistant enterococci. However, 15% of tested *S. aureus* strains (sensitive to methicillin) showed to be resistant. Regarding the synergy studies, combinations of daptomycin + LP9666 and daptomycin + NCL 195 are promising and deserve further studies in this regard. The studies conducted in this work will contribute to assess the quality, safety and therapeutic efficacy of daptomycin in lyophilized powder, in addition to expanding the scientific knowledge related to this antimicrobial agent.

Keywords: Analytical methods. Capillary electrophoresis. Daptomycin. HPLC. Microbiological study. Quality control. Spectrophotometry. Stability. Synergy. Turbidimetric assay.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
3.1. LIPOPEPTÍDEOS CÍCLICOS.....	32
3.2. DAPTOMICINA	34
3.2.1. <i>Considerações gerais e históricas</i>	34
3.2.2. <i>Estrutura química</i>	36
3.2.3. <i>Mecanismo de ação</i>	37
3.2.4. <i>Resistência bacteriana</i>	38
3.2.5. <i>Farmacocinética</i>	40
3.2.6. <i>Espectro de ação e uso clínico</i>	41
3.2.7. <i>Reações adversas</i>	42
3.2.8. <i>Interações medicamentosas</i>	43
3.2.9. <i>Combinação da daptomicina com outros antimicrobianos</i>	43
3.2.10. <i>Métodos analíticos e estudos de estabilidade descritos para a daptomicina</i>	44
3.3. GARANTIA DA QUALIDADE	50
3.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	51
3.5. QUÍMICA ANALÍTICA VERDE	55
4. DESCRIÇÃO	58
4.1. DESCRIÇÃO GERAL	58
4.2. SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)	58
4.3. AMOSTRA DA FORMA FARMACÊUTICA DO PÓ LIOFILIZADO PARA SOLUÇÃO INJETÁVEL	58
4.4. DILUENTE DA FORMA FARMACÊUTICA	59
4.5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DA FORMA FARMACÊUTICA.....	59
5. ANÁLISE QUALITATIVA.....	60
5.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	60
5.1.1. <i>Material e método</i>	60

5.1.2. Resultados e discussão.....	60
5.2. DETERMINAÇÃO DO PONTO DE FUSÃO	60
5.2.1. Material e método	60
5.2.2. Resultados e discussão.....	61
5.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) INDICATIVA DE ESTABILIDADE.....	61
5.3.1. Considerações gerais.....	61
5.3.2. Material e método	62
5.3.3. Resultados e discussão.....	66
5.4. ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (UV)	73
5.4.1. Considerações gerais.....	73
5.4.2. Material.....	74
5.4.3. Método.....	74
5.4.4. Resultados	75
5.4.5. Discussão	79
5.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	80
5.5.1. Considerações gerais.....	80
5.5.2. Material.....	81
5.5.3. Método.....	82
5.5.4. Resultados	86
5.5.5. Discussão	92
5.6. ELETROFORESE CAPILAR (EC).....	95
5.6.1. Considerações gerais.....	95
5.6.2. Material.....	96
5.6.3. Método.....	97
5.6.4. Resultados	101
5.6.5. Discussão	105
5.7. ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO	108
5.7.1. Considerações gerais.....	108
5.7.2. Material.....	109
5.7.3. Método.....	110
5.7.4. Resultados	111
5.7.5. Discussão	115

6. ANÁLISE QUANTITATIVA	118
6.1. ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO UV	118
6.1.1. <i>Considerações gerais</i>	118
6.1.2. <i>Material</i>	119
6.1.3. <i>Método</i>	119
6.1.4. <i>Resultados</i>	125
6.1.5. <i>Discussão</i>	130
6.2. ENSAIO MICROBIOLÓGICO PELO MÉTODO TURBIDIMÉTRICO	132
6.2.1. <i>Considerações gerais</i>	132
6.2.2. <i>Material</i>	133
6.2.3. <i>Método</i>	134
6.2.4. <i>Resultados</i>	142
6.2.5. <i>Discussão</i>	147
6.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) INDICATIVA DE ESTABILIDADE	150
6.3.1. <i>Considerações gerais</i>	150
6.3.2. <i>Material</i>	151
6.3.3. <i>Método</i>	152
6.3.4. <i>Resultados</i>	159
6.3.5. <i>Discussão</i>	169
6.4. ELETROFORESE CAPILAR INDICATIVA DE ESTABILIDADE	173
6.4.1. <i>Considerações gerais</i>	173
6.4.2. <i>Material</i>	176
6.4.3. <i>Método</i>	176
6.4.4. <i>Resultados</i>	183
6.4.5. <i>Discussão</i>	191
6.5. ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO	195
6.5.1. <i>Considerações gerais</i>	195
6.5.2. <i>Material</i>	197
6.5.3. <i>Método</i>	197
6.5.4. <i>Resultados</i>	202
6.5.5. <i>Discussão</i>	205
7. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PROPOSTOS	208

8. ESTUDO DE ESTABILIDADE	213
8.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	213
8.2. MATERIAL	216
8.3. MÉTODOS	217
8.3.1. <i>Estudo de degradação forçada da daptomicina SQR</i>	217
8.3.2. <i>Estudos de estabilidade acelerado e de longa duração</i>	218
8.4. RESULTADOS	219
8.4.1. <i>Estudo de degradação forçada da daptomicina</i>	219
8.4.2. <i>Estudos de estabilidade acelerado e de longa duração</i>	226
8.5. DISCUSSÃO.....	228
8.5.1. <i>Estudo de degradação forçada da daptomicina</i>	228
8.5.2. <i>Estudos de estabilidade acelerado e de longa duração</i>	231
9. ESTUDO MICROBIOLÓGICO DA DAPTOMICINA.....	233
9.1. MATERIAL	234
9.1.1. <i>Teste de sensibilidade à daptomicina</i>	234
9.1.2. <i>Ensaio preliminares de sinergia</i>	236
9.2. MÉTODO.....	237
9.2.1. <i>Teste de sensibilidade à daptomicina</i>	237
9.2.2. <i>Ensaio preliminares de sinergia</i>	241
9.3. RESULTADOS	251
9.3.1. <i>Teste de sensibilidade à daptomicina</i>	251
9.3.2. <i>Ensaio preliminares de sinergia</i>	255
9.4. DISCUSSÃO	261
9.4.1. <i>Teste de sensibilidade à daptomicina</i>	261
9.4.2. <i>Ensaio preliminares de sinergia</i>	263
10.DISCOSSÃO GERAL	268
11.CONCLUSÕES.....	274
12. .ARTIGOS PUBLICADOS E APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS.....	276
13. REFERÊNCIAS	279

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da daptomicina (CAS 103060-53-3).....	36
Figura 2	Mecanismo de ação da daptomicina.....	38
Figura 3	Cromatogramas obtidos com os Sistemas 1, 2 e 3 durante desenvolvimento de método de CCD para análise da daptomicina em pó liofilizado.....	67
Figura 4	Cromatogramas obtidos com os Sistemas 4, 5, 6 e 7 durante desenvolvimento de método de CCD para análise da daptomicina em pó liofilizado.....	68
Figura 5	Cromatograma obtido na análise do excipiente da amostra de daptomicina em pó para solução injetável durante desenvolvimento de método de CCD para análise da daptomicina em pó liofilizado.....	70
Figura 6	Cromatogramas obtidos no estudo de degradação forçada da amostra de daptomicina em pó para solução injetável obtidos durante desenvolvimento de método de CCD para análise da daptomicina em pó liofilizado.....	72
Figura 7	Espectro de absorção da solução de daptomicina SQR com concentração de 12 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando água como solvente....	76
Figura 8	Espectros de absorção da solução de daptomicina SQR com concentração de 12 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando os seguintes solventes: a) metanol; b) HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M.....	77
Figura 9	Sobreposição dos espectros de absorção da daptomicina SQR e amostra de pó liofilizado para solução injetável, na concentração de 12 µg/mL, utilizando água como solvente.....	78
Figura 10	Sobreposição dos espectros de absorção da daptomicina SQR (12 µg/mL) e solução de placebo (NaOH), utilizando água como solvente.....	78
Figura 11	Medidas relacionadas à determinação dos fatores de cauda (FC) e assimetria do pico cromatográfico (A_s), calculados pelas Equações 3 e 4.	85
Figura 12	Cromatogramas referentes aos Sistemas 5 a 14, obtidos durante os ensaios preliminares para a análise da daptomicina por CLAE.....	89

Figura 13	Cromatograma de daptomicina SQR (40 µg/mL) obtido pelo Sistema 9 durante os ensaios preliminares para a análise da daptomicina por CLAE	90
Figura 14	Sobreposição de cromatogramas de daptomicina SQR e em pó para solução injetável (40 µg/mL) obtidos pelo método de CLAE desenvolvido.....	91
Figura 15	Sobreposição de cromatogramas de daptomicina SQR e solução de placebo para a análise da seletividade do método de CLAE desenvolvido.	92
Figura 16	Eletoferogramas referentes aos Sistemas 1 a 6, obtidos durante os ensaios preliminares para a análise da daptomicina por eletroforese capilar.....	102
Figura 17	Eletoferograma de daptomicina SQR (100 µg/mL) obtido pelo Sistema 6 durante os ensaios preliminares para a análise da daptomicina por eletroforese capilar. Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM; tensão: 15 kV; capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm.....	103
Figura 18	Sobreposição de eletroferogramas de daptomicina SQR e em pó para solução injetável (100 µg/mL) obtidos pelo método de eletroforese capilar desenvolvido. Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM; tensão: 15 kV; capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm.....	104
Figura 19	Sobreposição de eletroferogramas de daptomicina SQR e solução de placebo para a análise da seletividade do método de eletroforese capilar desenvolvido. Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM; tensão: 15 kV; capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm.....	105
Figura 20	Sobreposição de espectros de absorção na região do infravermelho médio de daptomicina SQR e em pó para solução injetável (0,4 mg/150 mg).....	112
Figura 21	Sobreposição de espectros de absorção na região do infravermelho médio de daptomicina SQR (0,4 mg/150 mg) e placebo (1,0 mg/150 mg), com a delimitação da região escolhida para análise quantitativa (de 1700 a 1600 cm ⁻¹).....	113

Figura 22	Espectro de absorção na região do infravermelho médio de daptomicina SQR (0,4 mg/150 mg) com suas principais bandas de absorção marcadas.	114
Figura 23	Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para daptomicina SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 221 nm.....	126
Figura 24	Curva analítica de daptomicina SQR, obtida pelo método de espectrofotometria na região do UV, utilizando água como solvente, a 221nm.....	128
Figura 25	Representação gráfica das curvas analíticas de soluções de daptomicina SQR e amostra, em concentrações de 8,0; 12,0 e 18,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico	144
Figura 26	Curva analítica de daptomicina SQR obtida pelo método de CLAE desenvolvido.....	161
Figura 27	Cromatogramas da amostra de daptomicina em pó para solução injetável (40 µg/mL) submetida à degradação em meio ácido (HCl 0,01 M) a 60 °C.....	166
Figura 28	Cromatogramas da amostra de daptomicina em pó para solução injetável (40 µg/mL) submetida à degradação em meio alcalino (NaOH 0,001 M) a 60 °C.....	166
Figura 29	Cromatogramas da amostra de daptomicina em pó para solução injetável (40 µg/mL) submetida à degradação em meio aquoso (H ₂ O) a 60 °C.....	167
Figura 30	Cromatogramas da amostra de daptomicina em pó para solução injetável (40 µg/mL) submetida à degradação em meio oxidativo (H ₂ O ₂ 0,3%) a 60 °C.....	167
Figura 31	Cromatograma da amostra de daptomicina em pó para solução injetável (40 µg/mL) submetida à degradação em meio fotolítico (luz UVC) após 7 dias.....	168
Figura 32	Curva analítica de daptomicina SQR obtida pelo método de eletroforese capilar desenvolvido. Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM; tensão: 15 kV; capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm.....	185

Figura 33	Eletroferogramas da amostra de daptomicina em pó para solução injetável (100 µg/mL) submetida à degradação em: a) meio alcalino (NaOH 0,001 M) a 60 °C após 1,5 h; b) meio ácido (HCl 0,01 M) a 60 °C após 1,5 h; c) meio aquoso (H ₂ O) a 60 °C após 6 h; d) meio oxidativo (H ₂ O ₂ 0,3%) a 60 °C após 0,5 h; e) meio fotolítico (luz UVC) após 7 dias.....	190
Figura 34	Curva analítica de daptomicina SQR, obtida pelo método de espectrofotometria na região do infravermelho médio (1700-1600 cm ⁻¹)...	203
Figura 35	a) Representação gráfica da degradação aquosa de daptomicina; b) Cromatograma obtido no terceiro dia da degradação aquosa.....	219
Figura 36	a) Representação gráfica da degradação alcalina de daptomicina; b) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação com NaOH 0,1 M; c) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação com NaOH 0,001 M.....	220
Figura 37	a) Representação gráfica da degradação ácida de daptomicina; b) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação com HCl 0,1 M; c) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação com HCl 0,01 M.....	221
Figura 38	a) Representação gráfica da degradação oxidativa de daptomicina; b) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação com H ₂ O ₂ 3%; c) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação com H ₂ O ₂ 0,3%..	222
Figura 39	a) Representação gráfica da degradação fotolítica de daptomicina; b) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação fotolítica.....	223
Figura 40	a) Representação gráfica da degradação térmica de daptomicina; b) Cromatograma obtido no segundo dia da degradação a 40 °C; c) Cromatograma obtido no segundo dia da degradação a 60 °C.....	224
Figura 41	a) Representação gráfica da degradação pH dependente de daptomicina; b) Cromatograma obtido no segundo dia da degradação em pH 2,0; c) Cromatograma obtido no segundo dia da degradação em pH 4,0; d) Cromatograma obtido no sexto dia da degradação em pH 6,0; e) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação em pH 8,0.....	225
Figura 42	Perfil de decaimento dos teores de daptomicina em pó liofilizado durante o estudo de estabilidade acelerado, através dos métodos turbidimétrico, CLAE e UV.....	226

Figura 43	Perfil de decaimento dos teores de daptomicina em pó liofilizado durante o estudo de estabilidade de longa duração, através dos métodos turbidimétrico, CLAE e UV.....	227
Figura 44	Esquema do método de microdiluição em caldo.....	240
Figura 45	Esquema do método de <i>Time-Kill</i>	249
Figura 46	Curvas representativas das atividades antimicrobianas da daptomicina (0,125 µg/mL), do LP9666 (0,125 µg/mL) e da combinação entre eles (0,125 µg/mL cada), frente a <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (em relação ao controle de crescimento).....	261

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Antimicrobianos lipopeptídeos cíclicos.....	33
Tabela 2	Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de daptomicina.....	46
Tabela 3	Testes exigidos para cada categoria de métodos analíticos.....	52
Tabela 4	Análise por CCD da degradação forçada de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável.....	71
Tabela 5	Comprimentos de onda de máxima absorção e seus respectivos valores de absorvância determinados para a daptomicina SQR (12 µg/mL) em diferentes solventes.....	75
Tabela 6	Parâmetros cromatográficos testados durante ensaios preliminares para desenvolvimento de método por CLAE, para quantificação de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável.....	83
Tabela 7	Parâmetros estabelecidos para a determinação de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável pelo método de CLAE.....	84
Tabela 8	Análise de conformidade do sistema obtida para os sistemas cromatográficos testados durante os testes preliminares para desenvolvimento de método qualitativo de CLAE.....	88
Tabela 9	Análise de conformidade do Sistema 9 - fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial; fase estacionária: Agilent Zorbax C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm).....	90
Tabela 10	Parâmetros eletroforéticos testados durante ensaios preliminares para desenvolvimento de método por EC, para identificação e quantificação de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável.....	99
Tabela 11	Parâmetros estabelecidos para a determinação de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável pelo método de EC.....	99
Tabela 12	Parâmetros obtidos na análise de conformidade do Sistema 6 - eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM; tensão: 15 kV; capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm.....	103

Tabela 13	Comparação das bandas de absorção apresentadas pela daptomicina SQR na região do infravermelho médio com dados apresentados na literatura.....	115
Tabela 14	Obtenção da curva de Ringbom para a determinação da faixa de linearidade do método espectrofotométrico na região do UV para análise de daptomicina a 221 nm.....	120
Tabela 15	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV para daptomicina.....	123
Tabela 16	Valores obtidos na construção da curva de Ringbom pelo método espectrofotométrico na região do UV para daptomicina SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 221 nm.....	126
Tabela 17	Valores de absorvância determinados para a curva analítica de daptomicina SQR, pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando água como solvente, a 221 nm.....	127
Tabela 18	Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de daptomicina SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV.....	128
Tabela 19	Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método espectrofotométrico na região do UV para análise de daptomicina em pó liofilizado.....	129
Tabela 20	Determinação da exatidão do método analítico para análise de daptomicina por espectrofotometria na região do UV.....	129
Tabela 21	Avaliação da robustez do método analítico para análise de daptomicina por espectrofotometria na região do UV.....	130
Tabela 22	Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico para análise da potência da daptomicina na forma farmacêutica.....	135
Tabela 23	Parâmetros estabelecidos para a determinação da potência da daptomicina em pó para solução injetável pelo método turbidimétrico.....	136
Tabela 24	Valores de absorvância determinados para a construção da curva analítica de daptomicina pelo método turbidimétrico.....	143

Tabela 25	Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de daptomicina, utilizando o método turbidimétrico.....	144
Tabela 26	Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método turbidimétrico para análise de daptomicina em pó liofilizado.....	145
Tabela 27	Teores obtidos no teste de recuperação do método turbidimétrico para determinação da potência de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável.....	145
Tabela 28	Valores obtidos na avaliação da robustez do método turbidimétrico para análise da potência de daptomicina em pó para solução injetável.....	146
Tabela 29	Valores de absorvância obtidos na análise da seletividade do método turbidimétrico para análise da potência de daptomicina em pó para solução injetável.....	147
Tabela 30	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico para daptomicina.....	154
Tabela 31	Combinação fatorial proposta pelo modelo Plackett-Burman.....	155
Tabela 32	Fatores e níveis de variação selecionados para avaliação da robustez do método cromatográfico para análise de daptomicina.....	156
Tabela 33	Valores das áreas referentes ao pico de daptomicina SRQ para a construção da curva analítica de CLAE.....	160
Tabela 34	Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de daptomicina SQR, utilizando o método de CLAE.....	161
Tabela 35	Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método para a análise da daptomicina por CLAE.....	162
Tabela 36	Determinação da exatidão do método analítico para análise de daptomicina por CLAE.....	162
Tabela 37	Valores obtidos em cada variação no teste de Plackett-Burman para o método de CLAE.....	163

Tabela 38	Estudo de degradação forçada da amostra de daptomicina em pó para solução injetável para avaliação da seletividade do método de CLAE.....	165
Tabela 39	Análise da pureza dos picos de daptomicina após a degradação forçada.....	168
Tabela 40	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método de eletroforese capilar para daptomicina.....	180
Tabela 41	Fatores e níveis de variação selecionados para avaliação da robustez do método de eletroforese capilar para análise de daptomicina.....	181
Tabela 42	Valores das áreas referentes ao pico de daptomicina SRQ para a construção da curva analítica de eletroforese capilar.....	184
Tabela 43	Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de daptomicina SQR, utilizando o método de eletroforese capilar.....	185
Tabela 44	Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método para a análise da daptomicina por eletroforese capilar.....	186
Tabela 45	Determinação da exatidão do método analítico para análise de daptomicina por eletroforese capilar.....	186
Tabela 46	Valores obtidos em cada variação no teste de Plackett-Burman para o método de eletroforese capilar.....	187
Tabela 47	Estudo de degradação forçada da amostra de daptomicina em pó para solução injetável para avaliação da seletividade do método de eletroforese capilar.....	189
Tabela 48	Preparo das soluções para o teste de recuperação do método de espectrofotometria na região do infravermelho médio.....	201
Tabela 49	Valores de absorvância determinados para a curva analítica de daptomicina SQR pelo método de espectrofotometria na região do infravermelho médio (1700-1600 cm ⁻¹).....	202

Tabela 50	Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de daptomicina SQR, utilizando o método de espectrofotometria na região do infravermelho médio (1700-1600 cm ⁻¹)..	203
Tabela 51	Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método de espectrofotometria na região do infravermelho médio (1700-1600 cm ⁻¹) para análise de daptomicina em pó liofilizado.....	204
Tabela 52	Determinação da exatidão do método analítico para análise de daptomicina por espectrofotometria na região do infravermelho médio (1700-1600 cm ⁻¹).....	204
Tabela 53	Avaliação da robustez do método analítico para análise de daptomicina por espectrofotometria na região do infravermelho médio (1700-1600 cm ⁻¹).....	205
Tabela 54	Valores obtidos na determinação do teor de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável utilizando os métodos analíticos propostos.....	208
Tabela 55	Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável pelos métodos analíticos propostos.....	209
Tabela 56	Principais características dos métodos propostos.....	210
Tabela 57	Valores obtidos na determinação do teor de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável durante estudo de estabilidade acelerado, pelos métodos turbidimétrico, CLAE e UV.....	226
Tabela 58	Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável durante estudo de estabilidade acelerado.....	227
Tabela 59	Valores obtidos na determinação do teor de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável durante estudo de estabilidade de longa duração, pelos métodos turbidimétrico, CLAE e UV.....	228
Tabela 60	Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável durante estudo de estabilidade de longa duração.....	228
Tabela 61	Combinações entre daptomicina e LP9666, NCL 195 e NCL 219, realizadas durante a primeira etapa dos estudos preliminares de sinergia..	243

Tabela 62	Combinações entre daptomicina, LP9666 e NCL 195, realizadas durante a segunda etapa dos estudos preliminares de sinergia.....	244
Tabela 63	Classificação da interação entre antimicrobianos.....	246
Tabela 64	Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) encontrados para a daptomicina e ampicilina sódica (controle do método) quando testadas contra 13 cepas de <i>S. aureus</i>	252
Tabela 65	Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) encontrados para a daptomicina e ampicilina sódica (controle do método) quando testadas contra 26 cepas de MRSA..	253
Tabela 66	Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) encontrados para a daptomicina e ampicilina sódica (controle do método) quando testadas contra 20 cepas de <i>S. pneumoniae</i>	254
Tabela 67	Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) encontrados para a daptomicina e ampicilina sódica (controle do método) quando testadas contra 20 cepas de VRE.....	255
Tabela 68	CIM para daptomicina e LP9666 antes e depois do ensaio de sinergia.....	256
Tabela 69	CIM para daptomicina e NCL 219 antes e depois do ensaio de sinergia...	257
Tabela 70	CIM para daptomicina e NCL 195 antes e depois do ensaio de sinergia...	258
Tabela 71	CIM ($\mu\text{g/mL}$) para daptomicina, LP9666 e NCL 195 antes e depois no ensaio de sinergia.....	259
Tabela 72	CIM ($\mu\text{g/mL}$) para daptomicina e LP9666 antes e depois da combinação, frente ao <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	260

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

As: fator de assimetria

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: *Brain-Heart Infusion*

BPF: Boas Práticas de Fabricação

CAMHB: caldo Mueller-Hinton cátion ajustado

CAS: *Chemical Abstract Service*

CCD: cromatografia em camada delgada

CE: *capillary electrophoresis*

CIM: concentração inibitória mínima

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CLUE: cromatografia líquida de ultra eficiência

CPK: creatinofosfoquinase

DAD: detector por arranjo de diodos

DCB: Denominação Comum Brasileira

DEG: produto de degradação

DMSO: dimetilsulfóxido

DNSE: enterococos não-suscetíveis à daptomicina

DPR: desvio padrão relativo

DPT: daptomicina

EC: eletroforese capilar

EMA: *European Medicines Agency*

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FC: fator de cauda

F_{cal}: valor de F calculado

FDA: *Food and Drug Administration*

FEO: fluxo eletroosmótico

FT: transformada de Fourier

F_{tab}: valor de F tabelado

GL: graus de liberdade

HPLC: *high performance liquid chromatography*

IAL: Instituto Adolfo Lutz

ICH: *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

ICIF: índice de concentração inibitória fracionada

IR: infravermelho (*infrared* na língua inglesa)

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

k: fator de retenção

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, na língua inglesa)

N: número de pratos

OMS: Organização Mundial da Saúde

p_{ka}: constante de dissociação

QM: quadrados médios

r: coeficiente de correlação

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

R_f: fator de retenção

RMN: ressonância magnética nuclear

RRLC: cromatografia líquida de rápida resolução (*rapid resolution liquid chromatography*, na língua inglesa)

SGA: Sistema de Gestão Ambiental

SQ: soma dos quadrados

SQR: substância química de referência

t_R : tempo de retenção

TSA: teste de sensibilidade a antibióticos

t_m : tempo de migração

UFC: unidades formadoras de colônia

UniSA: *University of South Australia*

UR: umidade relativa

UV: ultravioleta

VISA: *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina (*vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*, na língua inglesa)

VRE: enterococos resistentes à vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci*, na língua inglesa)

VRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (*vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*, na língua inglesa).

1. INTRODUÇÃO

O advento da resistência a antimicrobianos emergiu como uma crise de proporção global no decorrer das últimas décadas. Micro-organismos resistentes a um grande número de antimicrobianos clinicamente aprovados são cada vez mais comuns e estão se espalhando com facilidade entre os continentes. Este fenômeno representa uma ameaça à saúde pública, já que limita as opções para o tratamento das infecções microbianas (SILVEIRA et al., 2006; WRIGHT, 2011). Ao lado disso, existem poucos novos agentes antimicrobianos surgindo no mercado (WRIGHT, 2011; PIDDOCK, 2011; BLAIR et al., 2015). Desta maneira, o desenvolvimento de novos fármacos, com a capacidade de contornar esses mecanismos de resistência, representa importante avanço na prática clínica.

Como estratégia no combate aos micro-organismos resistentes, o desenvolvimento de fármacos com novos mecanismos de ação encontra-se em evidência. Neste contexto, destaca-se uma nova classe de antimicrobianos, a dos lipopeptídeos cíclicos, a qual possui a daptomicina como primeiro membro aprovado, fármaco que possui mecanismo de ação distinto de todos os outros antimicrobianos existentes no mercado (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Considerando que a resistência à daptomicina não é muito comum, este fármaco é uma das promessas para o combate a bactérias Gram-positivas resistentes à meticilina e à vancomicina (SILVEIRA et al., 2006; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). Apresenta atividade contra estreptococos beta-hemolíticos, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e enterococos resistentes à vancomicina (VRE) (SILVERMAN; PERLMUTTER; SHAPIRO, 2003). Também exibe atividade contra *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA) (BUBALO et al., 2008). É indicado para o tratamento de infecções de pele e tecidos moles, assim como para infecções da corrente sanguínea (septicemia) causadas por *Staphylococcus aureus*, incluindo aquelas associadas à endocardite infecciosa do lado direito (MERCK, 2016a). Na literatura também encontra-se relato do uso deste antimicrobiano, com sucesso, no tratamento de pielonefrite associada à VRE (SHEA et al., 2008).

Desde sua criação, em 1948, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem se preocupado com a qualidade de produtos farmacêuticos. Esta organização acredita que sem a garantia de que os medicamentos comercializados atendam a padrões aceitáveis de qualidade,

eficácia e segurança, todos os serviços de saúde podem ser comprometidos. Isto, aliado ao fato de que todo governo destina uma parte substancial do seu orçamento na área da saúde para os medicamentos, faz com que a OMS defenda que um sistema confiável de controle de qualidade de medicamentos seja trazido ao alcance de todos os países (WHO, 2007).

Para garantir a qualidade dos medicamentos comercializados, é de fundamental importância que o Controle de Qualidade conte com métodos analíticos eficazes e totalmente confiáveis. Assim, a necessidade de se comprovar também a qualidade dos métodos analíticos utilizados durante e depois da fabricação dos medicamentos tornou-se indispensável. Para isso, a etapa de validação de métodos analíticos é essencial, pois apresenta impacto direto sobre a qualidade dos dados analíticos gerados (LA ROCA et al., 2007). Esta etapa garante que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra (RIBANI et al., 2004).

Ao lado da preocupação com a qualidade dos dados analíticos, também há a preocupação com os impactos que as atividades das indústrias podem causar sobre o meio ambiente. Cada vez mais, estas empresas buscam alternativas ambientalmente favoráveis em relação aos processos que seguem em sua rotina, adotando uma postura de redução, prevenção ou eliminação dos seus resíduos de processo. Para isso, existem algumas medidas que podem ser tomadas, entre elas, a substituição de técnicas analíticas que empreguem solventes orgânicos por outras que não os utilizem ou que minimizem seu uso (NOLASCO; TAVARES; BENDASSOLLI, 2006).

Avaliando todos estes fatos, um dos objetivos deste trabalho foi o desenvolvimento de métodos analíticos para a análise da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável, levando em consideração a minimização do uso de solventes orgânicos e a busca por métodos econômicos, práticos e seguros para os operadores. Esta etapa do trabalho contribui para a garantia da segurança e eficácia terapêutica deste medicamento comercializado no mercado.

Outra questão importante é a estabilidade dos medicamentos disponíveis para a prática clínica. Estabilidade pode ser definida como o tempo durante o qual o produto farmacêutico mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía no momento de sua fabricação (SILVA et al., 2009). É bem conhecido o fato de que fármacos podem sofrer degradação física e química durante o armazenamento, e isto torna os estudos de estabilidade extremamente importantes.

Assim, outro objetivo do trabalho foi a realização de estudos de estabilidade da daptomicina, os quais incluíram estudos de degradação forçada, acelerado e de longa duração.

Embora a daptomicina venha apresentando sucesso no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, alguns relatos de resistência a este fármaco têm surgido nos últimos anos (KELLEY et al., 2011; GASCH et al., 2014). Por esta razão, a última etapa deste trabalho teve como objetivo a realização de um estudo microbiológico deste antimicrobiano, o qual foi dividido em duas partes: na primeira, a sensibilidade de algumas bactérias Gram-positivas foi testada em relação à daptomicina; na segunda, estudos preliminares foram conduzidos, a fim de verificar a sinergia entre a daptomicina e outros agentes antimicrobianos que são objetos de estudo do grupo de pesquisa onde esta etapa do trabalho foi realizada, na *University of South Australia* (Adelaide, SA, Austrália). Estudos de sinergia são muito importantes, tanto para aumentar o espectro de atividade de um antimicrobiano quanto para reduzir o desenvolvimento de resistência, que é o grande desafio da atualidade.

Parte dos estudos de estabilidade e microbiológico da daptomicina foram conduzidos durante estágio de pesquisa na *University of South Australia* (UniSA) (Adelaide, SA, Austrália). Estes estudos foram fundamentais para gerar novos conhecimentos a respeito deste importante antimicrobiano e podem servir como base para novas pesquisas nesta área.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivos gerais o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável, assim como a realização de estudo de estabilidade e microbiológico deste antimicrobiano.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar análises qualitativas da amostra de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável através dos métodos tradicionais de controle de qualidade: características físicas; faixa de fusão; espectrofotometria nas regiões do ultravioleta (UV) e infravermelho (IR); cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar.
- Desenvolver e validar métodos analíticos ambientalmente favoráveis para análise quantitativa da daptomicina em pó liofilizado para solução injetável, empregando a espectrofotometria nas regiões do UV e IR médio, o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico, a CLAE com detecção UV (CLAE-UV) e a eletroforese capilar.
- Comparar estatisticamente os métodos propostos.
- Realizar estudo de degradação forçada da daptomicina.
- Realizar estudos de estabilidade acelerado e de longa duração da amostra de daptomicina.
- Verificar a sensibilidade de quatro bactérias (*Staphylococcus aureus*, MRSA, *Streptococcus pneumoniae* e VRE) em relação à daptomicina.
- Realizar estudo preliminar para avaliar a sinergia entre a daptomicina e outros agentes antimicrobianos (LP9666, NCL 195 e NCL 219).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

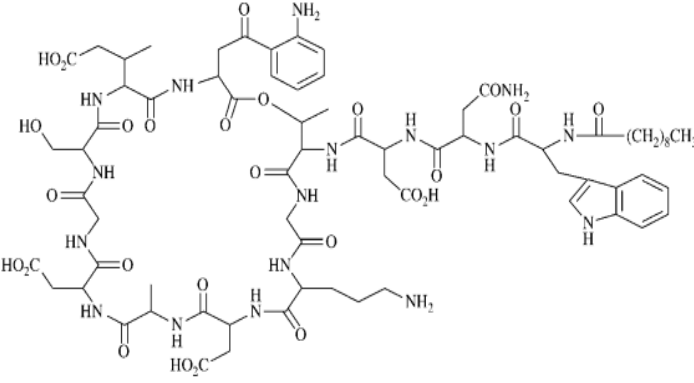
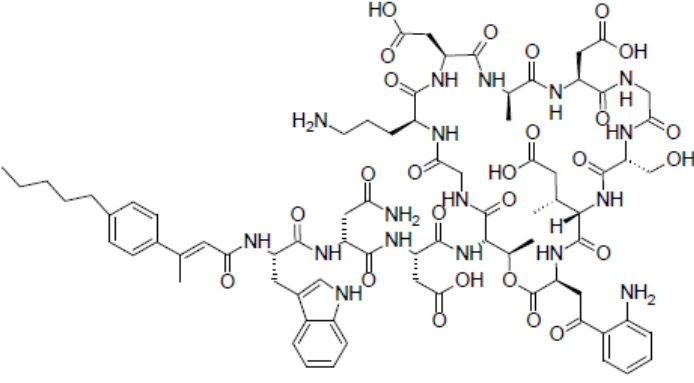
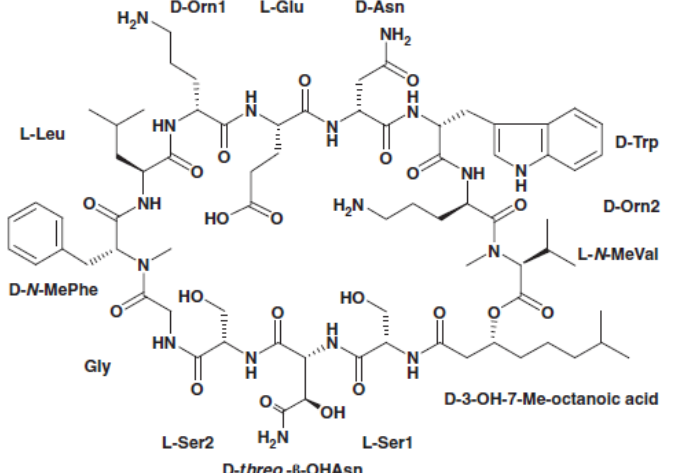
3.1. Lipopeptídeos cíclicos

O surgimento contínuo e a disseminação mundial de bactérias patogênicas humanas multirresistentes, principalmente em ambientes hospitalares, requerem esquemas terapêuticos cada vez mais eficientes e, além disso, o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos, capazes de contornar estes mecanismos de resistência (SCHNEIDER et al., 2014). No entanto, esta não é a realidade. Existem poucos agentes antimicrobianos novos surgindo no mercado e este fato pode ser devido a inúmeras razões, entre elas o alto custo para se colocar uma nova molécula em um mercado altamente competitivo e a dificuldade inerente de identificar novos alvos para antibióticos. Desta forma, é cada vez mais comum o surgimento de agentes infecciosos que já não respondem aos antimicrobianos de primeira linha (PIRRI et al., 2009; WRIGHT, 2011).

Como estratégia no combate aos micro-organismos resistentes, o desenvolvimento de fármacos com novos mecanismos de ação encontra-se em evidência. Neste contexto, destaca-se uma classe de antimicrobianos recentemente introduzida no mercado, a dos lipopeptídeos cíclicos, a qual possui a daptomicina como primeiro e único membro aprovado, fármaco que possui mecanismo de ação distinto de todos os outros antimicrobianos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). Trata-se de uma classe promissora, descoberta nos anos 1980, com potente atividade antibacteriana (PIRRI et al., 2009; SCHNEIDER et al., 2014).

A classe dos lipopeptídeos cíclicos é constituída por moléculas anfifílicas, compostas por uma cauda de ácido graxo unida a um oligopeptídeo que forma uma estrutura anelar macrocíclica (SCHNEIDER et al., 2014). Além da daptomicina, existem outros fármacos desta classe que estão em fase de desenvolvimento, tais como a surotomicina, pelo laboratório farmacêutico Merck e a lotilibicina, pelo laboratório farmacêutico Green Cross, da Coreia do Sul (MENDES; ANTUNES, 2013). A Tabela 1 apresenta os representantes da classe dos lipopeptídeos cíclicos com suas respectivas estruturas químicas.

Tabela 1- Antimicrobianos lipopeptídeos cíclicos

Antimicrobiano	Origem/Fonte	Estrutura química
Daptomicina (único aprovado para uso clínico)	Natural/ <i>Streptomyces roseosporus</i>	
Fonte: STEENBERGEN et al., 2005		
Surotomicina (Fase 3 de desenvolvimento clínico)	Semissintética/ a partir da daptomicina	
Fonte: MENDES, ANTUNES, 2013		
Lotilibicina (Fase 1 de desenvolvimento clínico)	Natural/ <i>Lisobacter</i> sp.	
Fonte: KATO et al., 2011		

A surotomicina, inicialmente designada CB-183,315, é um antimicrobiano para uso oral, estruturalmente relacionado à daptomicina, tratando-se de um derivado semissintético (BUTLER; BLASKOVICH; COOPER, 2013). Apresenta a mesma sequência de peptídeos

que a daptomicina, no entanto, possui um anel aromático contendo uma cauda lipídica insaturada (Tabela 1). Atualmente este fármaco encontra-se em Fase 3 de desenvolvimento clínico para o seu uso contra a diarreia associada a *Clostridium difficile* (MASCIO et al., 2012; GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2012; MERCK, 2016b). Apresenta eficiente atividade bactericida contra uma gama de cepas de *C. difficile*, incluindo a cepa altamente virulenta NAP1. Além disso, apresenta absorção sistêmica insignificante e baixo impacto sobre bactérias que fazem parte da microbiota intestinal (BUTLER; BLASKOVICH; COOPER, 2013).

A lotilibcina, inicialmente designada WAP-8294A₂, é um antimicrobiano em Fase 1 de desenvolvimento para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. É obtida a partir da bactéria Gram-negativa *Lisobacter* sp., que produz um complexo que contém pelo menos 20 componentes, sendo que o principal deles por apresentar maior atividade antibacteriana é o WAP-8294A₂, a lotilibcina (KATO et al., 2011). Estudos apontam que este antimicrobiano apresenta maior atividade *in vitro* contra MRSA que a vancomicina (KATO et al., 1997). Também apresenta atividade frente a VRE (SCHNEIDER et al., 2014). Estruturalmente, é um depsipeptídeo cíclico contendo 12 resíduos de aminoácidos e um resíduo de ácido graxo (Tabela 1) (KATO et al., 2011).

3.2. Daptomicina

3.2.1. Considerações gerais e históricas

A daptomicina foi descoberta e desenvolvida inicialmente por cientistas da indústria farmacêutica Eli Lilly e foi designada como LY146032, no início dos anos 1980 (PIRRI et al., 2009). Durante estudos iniciais, este fármaco se mostrou promissor como um antibiótico para tratar infecções causadas por bactérias Gram-positivas. No entanto, quando os cientistas da Eli Lilly administraram em indivíduos quantidades de daptomicina necessárias para tratar infecções graves, eles encontraram níveis inaceitáveis de toxicidade ao músculo esquelético e assim descontinuaram as suas pesquisas (EISENSTEIN; OLESON Jr.; BALTZ, 2010).

Em 1997, o laboratório farmacêutico Cubist licenciou os direitos mundiais para a daptomicina do laboratório que inicialmente a descobriu. O plano inicial era o desenvolvimento de um medicamento para administração tópica ou oral, para assim evitar a toxicidade descoberta anos antes, já que a absorção por estas vias era baixa e isso limitaria a

exposição sistêmica ao fármaco. No entanto, estudos realizados por cientistas da Cubist revelaram que se uma dose mais elevada da daptomicina fosse administrada uma vez por dia, a toxicidade seria minimizada. Esta descoberta levou a Cubist a desenvolver o medicamento para infecções graves (EISENSTEIN; OLESON Jr.; BALTZ, 2010).

O uso clínico da daptomicina para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, no entanto, só foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em setembro de 2003, nos Estados Unidos (LOPES, 2008; PIRRI et al., 2009). Dois anos mais tarde, em 2005, o uso da daptomicina foi aprovado pelo *European Medicines Agency* (EMA), na Europa (SADER et al., 2014). No ano de 2008 foi introduzida no mercado brasileiro (LOPES, 2008). Em 2014, o laboratório farmacêutico Merck comprou a Cubist Pharmaceuticals, ganhando acesso a este antibiótico.

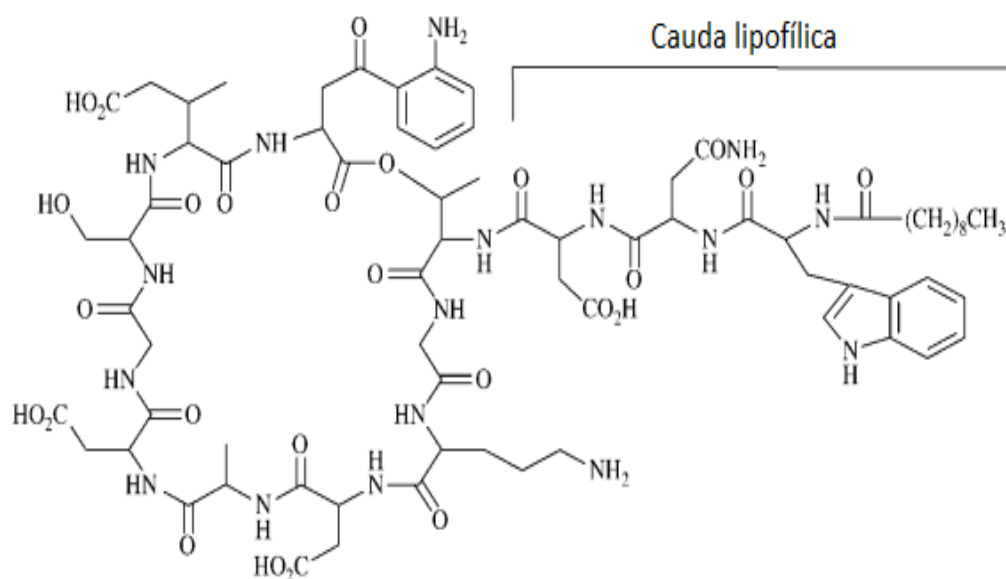
O nome comercial da daptomicina é Cubicin[®], o qual é comercializado na Alemanha, Argentina, Austrália, Áustria, Brasil, Chile, Colômbia, Croácia, Dinamarca, Eslovênia, Espanha, Finlândia, França, Grécia, Irlanda, Itália, Lituânia, Nova Zelândia, Noruega, Polônia, Portugal, Reino Unido, República Tcheca, Suécia, Suíça e Turquia pelo laboratório farmacêutico Novartis. No Canadá é comercializada pelas indústrias farmacêuticas Oryx e Sepracor, enquanto na China, em Cingapura, na Malásia, na Tailândia e nas Filipinas é comercializado pela AstraZeneca. Em Taiwan é comercializado pelos laboratórios Cardinal Health e TTY Biopharm. Em Luxemburgo, na Holanda e na Letônia, o Cubicin[®] é comercializado pelo laboratório Chiron. No Vietnã é comercializado pela companhia farmacêutica Hospira. Em Israel e nos Estados Unidos, é comercializado pelo laboratório farmacêutico Merck. No México, a daptomicina é comercializada como Cubicine[®] pelo laboratório farmacêutico Novartis (SWEETMAN, 2011; CUBICIN, 2015). O produto é vendido na apresentação de cartucho com 1 ou 5 frascos-ampola contendo 500 mg de daptomicina/frasco, na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável (MERCK, 2016a).

A daptomicina é um produto natural, isolado do fungo *Streptomyces roseosporus*, que possui elevada atividade sobre bactérias resistentes, tais como MRSA, VRE e VRSA (SILVERMAN; PERLMUTTER; SHAPIRO, 2003; BUBALO et al., 2009; LOPES, 2008). Considerando que a resistência à daptomicina não é muito comum, este fármaco é uma das promessas para o combate a bactérias Gram-positivas resistentes à meticilina e à vancomicina (SILVEIRA et al., 2006; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012).

3.2.2. Estrutura química

Quimicamente, a daptomicina (Figura 1) é conhecida como *N*-decanoil-L-triptofil-L-asparaginil-L-aspartil-L-treonilglicil-L-ornitil-L-aspartil-D-alanil-L-aspartilglicil-D-seril-*treo*-3-metil-L-glutamil-3-antranoil-L-alanina 1.13-3.4-lactona. A fórmula empírica é $C_{72}H_{101}N_{17}O_{26}$, com alto peso molecular, de 1620,7 g/mol (SWEETMAN, 2011).

Figura 1- Estrutura química da daptomicina (CAS 103060-53-3).



Fonte: STEENBERGEN et al., 2005

A molécula da daptomicina é composta por 13 resíduos de aminoácidos, os quais incluem três D-aminoácidos (D-asparagina, D-alanina e D-serina), três aminoácidos incomuns (ornitina, ácido [2S,3R]-3-metilglutâmico e quinurenina) e um ácido graxo *n*-decanoil, como cadeia terminal. Além disso, possui quatro resíduos ácidos (três resíduos de ácido aspártico e um de ácido 3-metil-glutâmico) e um resíduo básico (ornitina), resultando em uma carga molecular total de -3 em pH neutro. O peptídeo é cíclico por uma ligação éster que une os aminoácidos treonina e quinurenina (JUNG et al., 2004).

A carga molecular total de -3 e a natureza ácida da molécula de daptomicina em pH neutro são fatores que contam para sua alta solubilidade em água. Por outro lado, a sua cauda lipofílica e aminoácidos hidrofóbicos contribuem para o caráter anfifílico deste peptídeo. Como resultado, a daptomicina se agrega em estruturas oligoméricas em solução aquosa quando íons cálcio estão presentes no meio. A presença de íons cálcio em níveis fisiológicos

(1,25 mM) é um pré-requisito para a atividade antibacteriana da daptomicina (ELIOPOULOS et al., 1986; SCHNEIDER et al., 2014).

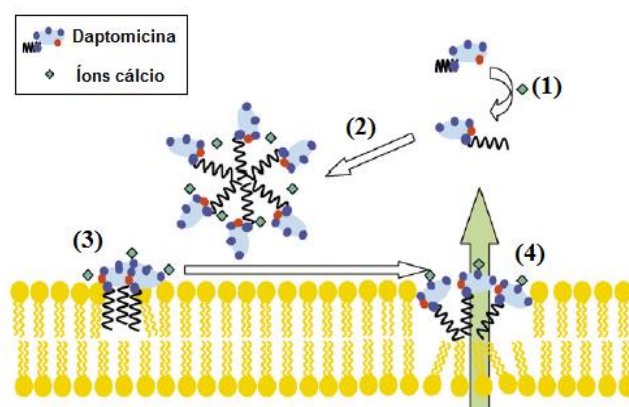
A molécula de daptomicina possui seis grupos ionizáveis em uma faixa de pH entre 0-14, os quais incluem quatro cadeias laterais de ácidos carboxílicos e duas aminas. Um dos grupos de ácidos carboxílicos (ácido [2S,3R]-3-metilglutâmico) possui valor de constante de dissociação (pKa) de 3,0, enquanto os outros três grupos (ácidos aspárticos) apresentam valores de pKa iguais, de 5,3 (23°C). O valor de pKa da amina aromática (quinurenina) é 0,8, enquanto o da amina alifática (ornitina) é 10,0 (25°C). Além disso, a daptomicina possui dois grupos fluoróforos, o triptofano e a quinurenina (MUANGSIRI et al., 2005).

3.2.3. Mecanismo de ação

O mecanismo de ação da daptomicina, embora ainda não esteja completamente elucidado, é dependente da presença de níveis fisiológicos de íons cálcio e baseia-se na inserção da daptomicina na membrana citoplasmática bacteriana, com posterior vazamento de íons intracelulares (principalmente íons potássio), resultando em despolarização, perda do potencial de membrana e a consequente inibição da síntese de proteínas, RNA e DNA (JUNG et al., 2004; HANCOCK, 2005).

A presença de íons cálcio é fundamental para a atividade bactericida da daptomicina, já que atuam em dois momentos fundamentais do mecanismo de ação deste antimicrobiano (Figura 2). Em um primeiro momento, favorecem uma alteração conformacional da molécula de daptomicina, que é globalmente polar, aumentando sua anfifilicidade, já que reúnem os aminoácidos carregados em um lado da molécula e expõem sua cauda lipofílica do outro lado. Em um segundo momento, os íons cálcio favorecem a oligomerização da daptomicina em estruturas micelares que, na presença de membranas carregadas negativamente, passam por uma transição estrutural que permite a interação das caudas lipofílicas da molécula com a membrana celular bacteriana. Após a inserção da estrutura micelar na membrana, há outra alteração conformacional, formando uma curvatura na membrana, a qual vai permitir o escape de íons intracelulares, inclusive potássio, resultando em perda do potencial de membrana e um rápido efeito bactericida. Vale lembrar que a daptomicina é ativa apenas contra bactérias Gram-positivas, considerando que não é capaz de atravessar a membrana externa das Gram-negativas (BAMBEKE et al., 2008).

Figura 2- Mecanismo de ação da daptomicina. (1) Alteração conformacional da molécula de daptomicina, mediada por íons cálcio, aumentando sua anfifilicidade. (2) Oligomerização da daptomicina em estruturas micelares, com auxílio de íons cálcio. (3) Inserção desta estrutura na membrana celular bacteriana. (4) Alteração conformacional, formando uma curvatura na membrana, o que induz o efluxo de íons intracelulares e morte bacteriana.



Fonte: adaptação de BAMBEKE et al., 2008

3.2.4. Resistência bacteriana

Nos últimos anos, a daptomicina vem sendo cada vez mais usada na prática clínica, principalmente nos Estados Unidos. Relatos de resistência a este antimicrobiano não são muito comuns, embora tenham surgido nos últimos anos. A daptomicina permanece muito ativa contra cepas de estafilococos e estreptococos (SADER et al., 2014). No entanto, o mecanismo pelo qual algumas bactérias podem se tornar resistentes à daptomicina ainda não está completamente elucidado (HAYDEN et al., 2005; CAFISO et al., 2014). Existem hipóteses de que este mecanismo possa estar relacionado a mutações genéticas, mudanças da fluidez de membranas, espessamento de parede celular bacteriana e alterações na carga de membranas (SADER et al., 2014).

Mutações genéticas em pontos únicos do gene *mprF*, conhecido como lisilfosfatidilglicerol sintetase, que regula alterações na membrana celular, são frequentemente encontradas em cepas resistentes à daptomicina (FRIEDMAN; ALDER; SILVERMAN, 2006).

O espessamento da parede celular bacteriana é uma característica comum em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à daptomicina. No entanto, o mecanismo que leva a este fenótipo permanece desconhecido. Em trabalho concretizado por Bertsche e colaboradores

(2011), foram analisadas cepas de *S. aureus* resistentes à daptomicina quanto à composição da sua parede celular e algumas observações foram realizadas: o grau de ligações cruzadas e de precursores de peptidoglicano é o mesmo em bactérias suscetíveis e não-suscetíveis; no entanto, notou-se que as bactérias não-suscetíveis apresentaram menor concentração de peptidoglicano O-acetilado e sintetizaram significativamente mais ácido teicoico. Também notou-se um aumento na expressão dos genes *tagA* e *dltA* e um aumento na carga superficial positiva, fatores que podem estar envolvidos na ocorrência do fenótipo citado.

Outro estudo, realizado por Mishira e colaboradores (2012), sugeriu que os MRSA não-suscetíveis à daptomicina podem ter sido influenciados por exposição anterior aos peptídeos endógenos de defesa do hospedeiro antes da exposição à daptomicina.

Outros tipos de patógenos recentemente relatados são os enterococos não-suscetíveis à daptomicina (DNSE). Um dado interessante é que muitos pacientes acometidos por DNSE nunca foram tratados previamente com daptomicina. Trabalho realizado por Kelesidis (2012) mostra que um dos possíveis mecanismos para isso seria o transporte de genes de resistência à daptomicina de animais para humanos, através da cadeia alimentar. O uso de antibióticos para promover o crescimento de animais pode estar acelerando o surgimento de cepas resistentes a antibióticos, tais como as DNSE. Assim, estas bactérias, quando presentes em alimentos de origem animal consumidos pelo homem, colonizariam o trato gastrointestinal humano e depois transmitiriam seus genes de resistência à daptomicina através de plasmídeos para os enterococos pertencentes à microbiota intestinal, tornando o indivíduo resistente a este lipopeptídeo cíclico. O que reforça esta teoria é um estudo realizado por Zhang e colaboradores (2010), no qual analisaram carne bovina e encontraram uma ocorrência de contaminação por enterococos maior que 62%, entre os quais mais que 20% eram resistentes à daptomicina.

Estudos revelam que exposição prévia e resistência à vancomicina podem ser fatores relacionados com o aumento da resistência de micro-organismos à daptomicina, sugerindo uma possível resistência cruzada (SAKOULAS et al., 2006).

Como mencionado anteriormente, existem alguns relatos na literatura de resistência à daptomicina, partindo de diversas bactérias, tais como: *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *E. faecalis* resistente à vancomicina, *E. faecium* e *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (VISA) (MUNOZ-PRICE; LOLANS; QUINN, 2005; SABOL et al., 2005; FOWLER et al., 2006; GREEN et al., 2006; SKIEST, 2006;

HIDRON et al., 2008; MALLI et al., 2008; SHARMA et al., 2008; MOHR et al., 2009; KELEY et al., 2011; SADER; JONES, 2012; GASCH et al., 2014).

No entanto, apesar de relatos de resistência à daptomicina terem surgido nos últimos anos, os casos de sucesso do seu uso no combate a bactérias Gram-positivas resistentes à meticilina e à vancomicina ainda predominam e este fármaco continua sendo uma promessa no combate a micro-organismos resistentes (COTTAGNOUD et al., 2004; FLUIT et al., 2004; STREIT; JONES; SADER, 2004; STREIT et al., 2005; DIEDEREN et al., 2006; SADER et al., 2006; SILVEIRA et al., 2006; SADER et al., 2007; JØRGEN; MERCKOLL; MELBY, 2007; ANASTASIOU et al., 2008; DHAWAN; GADEPALLI; KAPIL, 2009; MENDES et al., 2009; MURILLO et al., 2009; SADER; MOET; JONES, 2009a; SADER; MOET; JONES, 2009b; TRACZEWSKI et al., 2009; BELL et al., 2010; ENTENZA et al., 2010; KING et al., 2011; PICAZO et al., 2011; POEPPL et al., 2011; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012; EDEN et al., 2012; CHITNIS et al., 2013; LUCHTING et al., 2013; SADER et al., 2014; GUPTA et al., 2015).

3.2.5. Farmacocinética

A farmacocinética da daptomicina é geralmente linear (proporcional à dose), sendo recomendada para uso por via intravenosa, por infusão lenta (30 minutos), em dose única diária de 4 mg/kg para infecções de pele e partes moles e de 6 mg/kg para bacteremia (LOPES, 2008; SWEETMAN, 2011; KULLAR et al., 2011). A meia-vida sérica deste fármaco é de 8-9 horas e cerca de 80% da dose administrada é recuperada na urina, sendo que uma pequena quantidade é excretada nas fezes (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). Atinge a concentração plasmática máxima dentro de 30-48 minutos e possui baixo volume de distribuição (0,1 L/kg), o qual se limita ao sangue, fluidos intersticiais e tecidos altamente vascularizados (LOPES, 2008; SWEETMAN, 2011). A daptomicina apresenta uma alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas, de 90-93%, o que pode explicar o seu baixo volume de distribuição (ESTES; DERENDORF, 2010).

Estudo realizado por Abdel-Rahman e colaboradores (2008) avaliou a farmacocinética de uma dose única de daptomicina em crianças e adolescentes, de 2 a 17 anos, com suspeita ou diagnóstico de infecções causadas por bactérias Gram-positivas. Os autores verificaram que a exposição sistêmica ao antimicrobiano diminuiu com a redução da idade, o que mostra que quanto mais jovem é o indivíduo, mais rápido ocorre a depuração deste fármaco em seu

organismo. A meia-vida sérica da daptomicina foi em média 6,7 horas em adolescentes, 5,6 horas em crianças de 7 a 11 anos de idade e 5,3 horas em crianças menores que 6 anos. Em outro estudo, Dvorchik e Damphousse (2004) observaram que a exposição sistêmica à daptomicina foi 58% mais elevada em indivíduos idosos (> 75 anos de idade) em comparação com indivíduos mais jovens (18 a 30 anos de idade).

A daptomicina não é absorvida de maneira significativa após administração oral (LOPES, 2008; SWEETMAN, 2011). Outro estudo também mostrou que este antimicrobiano é inibido pelos surfactantes pulmonares, o que inviabiliza seu uso por esta via (SILVERMAN et al., 2004).

3.2.6. Espectro de ação e uso clínico

A daptomicina é um antimicrobiano ativo seletivamente contra bactérias Gram-positivas aeróbicas, facultativas e anaeróbicas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). Apresenta atividade contra estreptococos beta-hemolíticos, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e enterococos resistentes à vancomicina (SILVERMAN; PERLMUTTER; SHAPIRO, 2003). Também exibe atividade contra *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (BUBALO et al., 2008).

Segundo o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), a concentração inibitória mínima (CIM) de daptomicina para cepas suscetíveis de *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. dos grupos A, B, C e G é de ≤ 1 µg/mL, sendo consideradas resistentes quando apresentarem valores de CIM superiores a este, embora esta ocorrência seja rara. O mesmo comitê alega não ter evidências suficientes para afirmar que *Enterococcus* sp. é um bom alvo para terapia com este antimicrobiano (EUCAST, 2014). Segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), o valor de CIM para cepas suscetíveis de *Enterococcus* sp. é de ≤ 4 µg/mL, sendo que valores maiores que este são atribuídos a cepas resistentes (CLSI, 2012).

A daptomicina foi inicialmente aprovada nos Estados Unidos em 2003 e na Europa em 2005 para o tratamento de infecções agudas de pele e tecidos moles causadas por bactérias Gram-positivas suscetíveis, utilizando uma dose de 4 mg/kg, a cada 24 horas. Nos anos de 2006 (Estados Unidos) e 2007 (Europa), a daptomicina recebeu aprovação adicional para o tratamento de endocardite infecciosa do lado direito e infecções da corrente sanguínea (septicemia), causadas por *Staphylococcus aureus*, esta última quando associada à endocardite

infecçiosa do lado direito ou infecções de pele ou tecidos moles, com uma dose de 6 mg/kg a cada 24 horas (SADER et al., 2014).

Estudo realizado por Gould, Miró e Rybak (2013) sugere a utilização de doses mais elevadas de daptomicina (8-10 mg/kg) e combinações com outros antimicrobianos para alguns casos de infecções difíceis de serem tratadas, tais como bacteremia complicada ou persistente causada por MRSA, endocardite infecciosa de válvula nativa causada por MRSA, bacteremia complicada causada por enterococos, endocardite infecciosa, entre outros.

Shea e colaboradores (2008) também relataram o uso da daptomicina, com sucesso, no tratamento de pielonefrite associada a VRE em uma mulher com 27 semanas de gravidez. Não foram observadas anormalidades neonatais.

Seaton e colaboradores (2013) avaliaram o uso da daptomicina no tratamento de osteomielite, que é um complexo e heterogêneo grupo de infecções que requerem intervenções cirúrgicas e antimicrobianas. Os autores obtiveram taxa de 75% de sucesso clínico em um grupo de 220 pacientes tratados com este antimicrobiano. Além disso, segundo os autores, a daptomicina foi muito bem tolerada pelos pacientes. Neste estudo, os patógenos que foram isolados com maior frequência foram *Staphylococcus aureus* (33%) e *Staphylococcus coagulase positiva* (32%).

3.2.7. Reações adversas

Normalmente, a daptomicina é bem tolerada pelos pacientes quando administrada nas doses recomendadas e também em doses mais elevadas (GOULD; MIRÓ; RYBAK, 2013; SEATON et al., 2013). A principal toxicidade causada pela daptomicina é lesão do músculo esquelético, a qual era mais comum em esquemas terapêuticos baseados em duas doses diárias do antimicrobiano. Este efeito adverso foi minimizado consideravelmente com o uso de uma única dose diária do fármaco (EISENSTEIN; OLESON Jr.; BALTZ, 2010; ESTES; DERENDORF, 2010).

Uma reação adversa comum decorrente do uso de daptomicina é a elevação dos níveis séricos de creatinofosfoquinase (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). Estudo realizado por Kaya e colaboradores (2013) avaliou o uso da daptomicina no tratamento de pacientes com endocardite infecciosa. Nenhuma reação adversa significativa foi observada, sendo que as mais frequentes foram aumentos mínimos dos níveis de creatinofosfoquinase

(CPK) séricos durante o tratamento, os quais voltaram ao normal após cessar o uso do antimicrobiano (KAYA et al., 2013).

Algumas ocorrências de reações adversas mais graves foram relatadas, como é o caso de pneumonia eosinofílica aguda decorrente do uso da daptomicina (MILLER et al., 2010) e trombocitopenia imune (GRÉGOIRE et al., 2012).

3.2.8. Interações medicamentosas

Oleson, Berman e Li (2004) avaliaram o potencial da daptomicina em causar interações medicamentosas por meio de inibição ou indução do citocromo hepático P₄₅₀, chegando à conclusão que a daptomicina não afeta o metabolismo de fármacos metabolizados por esta enzima, não causando, portanto, interação por esta via. Isto ocorre porque a daptomicina é excretada intacta na urina, não sofrendo qualquer metabolização hepática ou interação com o citocromo P₄₅₀. Por outro lado, recomenda-se precaução ao administrar este lipopeptídeo cíclico com aminoglicosídeos ou estatinas, devido a possíveis riscos de nefrotoxicidade e miopatia, respectivamente (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012).

3.2.9. Combinação da daptomicina com outros antimicrobianos

Tendo em vista a crescente emergência de bactérias multirresistentes nos últimos anos, a necessidade de alternativas terapêuticas mais eficazes encontra-se em evidência. Neste contexto, a combinação de diferentes antimicrobianos se destaca. Este tipo de terapia é amplamente usado na prática clínica para aumentar o espectro de atividade antimicrobiana e reduzir o desenvolvimento de resistência.

Na literatura, alguns estudos de sinergia entre a daptomicina e outros agentes antimicrobianos foram realizados. Rand e Rouck (2004a) estudaram a sinergia entre a daptomicina e alguns β -lactâmicos no tratamento de infecções causadas por MRSA. Os pesquisadores concluíram que esta combinação de antimicrobianos é útil, mas um estudo mais aprofundado é necessário para uma conclusão mais segura. Os mesmos autores, em outro trabalho publicado no ano de 2004, observaram sinergia entre combinações de daptomicina tanto com rifampicina quanto com ampicilina no tratamento de infecções causadas por VRE (RAND; HOUCK, 2004b).

El-Shemi e Faidah (2011) realizaram um estudo *in vivo* em ratos para avaliar a sinergia entre a daptomicina e o ácido fusídico para o tratamento de infecção causada por

estreptococos do grupo B. Os autores observaram sinergia entre eles, já que esta combinação protegeu completamente os animais da infecção.

Leonard e Rolek (2013) estudaram a sinergia entre a daptomicina e a nafcilina em infecções causadas por VISA e observaram sinergia entre estes antimicrobianos.

Portanto, a terapia poliantibiótica é uma forte aliada para o tratamento de doenças causadas por bactérias multirresistentes e mais estudos nesta área são essenciais para se buscar alternativas terapêuticas mais eficazes no combate a estas bactérias.

3.2.10. Métodos analíticos e estudos de estabilidade descritos para a daptomicina

Na literatura existem poucos trabalhos publicados que apresentam o desenvolvimento de métodos analíticos para a análise da daptomicina, sendo a maior parte deles voltada para fluidos biológicos através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Ao mesmo tempo, não existem monografias deste fármaco descritas em nenhum compêndio oficial. A Tabela 2 apresenta os métodos analíticos descritos na literatura para a quantificação da daptomicina em diferentes matrizes.

Recentemente, Christ e colaboradores (2014) publicaram um trabalho em que foi desenvolvido um método analítico por CLAE para análise da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável. No entanto, os autores utilizaram como fase móvel uma mistura de solventes orgânicos potencialmente tóxicos (metanol e acetonitrila) e solução tampão, a qual pode precipitar e causar problemas de entupimento em colunas analíticas e em todo o sistema cromatográfico. Além disso, o pH da fase móvel foi ajustado para um nível extremamente ácido (2,2), o que também pode contribuir para reduzir a vida útil do sistema cromatográfico.

Outro trabalho foi encontrado para a análise da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável. No entanto, o trabalho está escrito na língua chinesa e as únicas informações disponíveis na língua inglesa, no resumo, são a respeito da fase móvel, constituída por uma mistura de acetonitrila e solução de di-hidrogenofosfato de amônio, utilizando coluna analítica C₈. Através destas informações, é possível observar o uso de solvente potencialmente tóxico, a acetonitrila, na constituição da fase móvel (GONG et al., 2014).

Em trabalho publicado em 1989, Kirsch e colaboradores (1989) identificaram dois produtos de degradação formados a partir da daptomicina. A via e a cinética da reação foram

delineadas em solução aquosa a 60 °C, em uma faixa de pH entre 3 e 8. Um dos produtos de degradação identificados foi um intermediário de succinimida (anidro daptomicina), o qual é formado a partir do ataque da carbonila à ligação peptídica do nitrogênio na sequência aspartil-glicil. O outro produto identificado foi o β -aspartil-daptomicina, formado a partir da reidratação da molécula de anidro daptomicina.

Muangsi e Kirsch (2001), mais tarde, identificaram um produto de degradação formado a partir da degradação alcalina da daptomicina. O estudo foi concretizado com soluções aquosas do antimicrobiano, em uma faixa de pH entre 9,0 e 10,5. A identificação da via da reação foi realizada por meio de espectrometria de massas, espectrofotometria com transformada de Fourier e fluorimetria. O produto de degradação formado foi chamado de “produto de anel aberto”, já que foi formado pela hidrólise do único grupamento éster presente na molécula de daptomicina, entre os resíduos de quinurenina e treonina, causando a abertura da grande estrutura cíclica formada pela união dos 13 resíduos de aminoácidos que compõem a estrutura química deste fármaco.

Em 2005, Muangsi e colaboradores (2005) avaliaram as vias de reação da daptomicina na presença de gliceraldeído em soluções ácidas. Os produtos formados foram separados por CLAE e identificados por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), fluorimetria, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN) bidimensional. Os produtos identificados foram a imina (base de Schiff) e derivados da anilida. A reação entre fármacos que possuam grupamentos amina com excipientes açucarados é conhecida e por isso foi explorada no trabalho citado.

A lacuna encontrada na literatura em relação a métodos analíticos práticos e ambientalmente favoráveis para a análise da daptomicina na forma farmacêutica, foi a motivação para um dos principais objetivos deste trabalho, que foi o desenvolvimento e validação de métodos analíticos menos tóxicos para o meio ambiente e operadores, para a análise da daptomicina em pó liofilizado. Também foi observada a necessidade de novos estudos de estabilidade, em condições de estresse não antes abordadas.

Tabela 2- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de daptomicina

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Tempo de corrida aproximado	Referência
CLAE	Coluna analítica C ₈ . Fase móvel: acetonitrila e solução de di-hidrogenofosfato de amônio (35:65, v/v). Modo isocrático.	UV em 220 nm	Pó liofilizado para solução injetável	N.D. ¹	GONG et al., 2014
CLUE	Coluna analítica Acquity UPLC [®] HSS T3, (150 x 2,1 mm; 1,8 µm), protegida por coluna-filtro <i>in-line</i> Waters Acquity UPLC [®] . Fase móvel: Solução A (tampão fosfato monopotássico 20 mM com pH ajustado para 3,2 com ácido ortofosfórico) e Solução B (acetonitrila). Vazão de 0,4 mL/min; modo gradiente.	UV-DAD em 262 nm	Plasma humano e manchas de plasma secas	8,0 min (t _R 4,70 min)	BAIETTO et al., 2014
CLAE	Coluna analítica Waters XBridge C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: metanol: acetonitrila: tampão fosfato (pH 2,2) (40:30:30, v/v/v). Vazão de 1,0 mL/min; modo isocrático.	UV-DAD em 223 nm	Pó liofilizado para solução injetável	t _R 6,1 min	CHRIST et al., 2014
CLUE	Coluna analítica C ₁₈ TSKgel ODS-140HTP (100 x 2,1 mm; 2,3 µm). Fase móvel: acetonitrila 47,5% contendo tampão fosfato 20 mM pH 3,0. Vazão de 1,0 mL/min; temperatura da coluna de 50 °C; modo isocrático.	UV em 225 nm	Plasma humano e urina	1 min (t _R 0,54 min)	NAITO et al., 2014
CLAE	Coluna analítica ACE C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: acetonitrila e água (com 0,1% de ácido fórmico ou acetato de amônio 5 mM). Vazão de 0,4 mL/min; modo isocrático.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Sangue total humano	< 9 min (t _R 6,24 min)	SZULTKA et al., 2013

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de daptomicina

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Tempo de corrida aproximado	Referência
RRLC (cromatografia líquida de resolução rápida)	Coluna analítica Agilent XDB C ₁₈ (50 x 4,6 mm; 1,8 µm). Fase móvel: ácido trifluoroacético 0,1% (TFA): acetonitrila (64:36, v/v). Vazão de 1,0 mL/min; temperatura da coluna de 30 °C; modo isocrático.	UV em 214 nm	Caldo de fermentação de <i>Streptomyces roseosporus</i>	N.D. ¹	ZHOU et al., 2012
CLUE	Coluna analítica Acquity BEH C ₁₈ (100 x 2,1 mm; 1,7 µm) com pré-coluna Waters VanGuard (5,0 x 2,1 mm; 1,7 µm). Fase móvel: solução aquosa de ácido fórmico 0,1% e acetonitrila com 0,1 de ácido fórmico. Vazão de 0,3 mL/min; temperatura da coluna de 40 °C; modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Plasma humano	3,5 min (t _R 2,6 min)	BAZOTI et al., 2011
CLAE	Coluna analítica C ₁₈ Hypersil Gold (50 x 2,1 mm; 3 µm). Fase móvel: inicialmente constituída por ácido fórmico 0,1%: água: acetonitrila (10:70:20, v/v/v). Vazão de 0,3 a 0,6 mL/min; temperatura da coluna de 30 °C; modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Plasma humano	11 min (t _R 4,5 min)	VERDIER et al., 2011
CLAE	Coluna analítica Synergy 4 µm Hydro-RP (250 x 4,6 mm), com pré-coluna Security Guard C ₁₈ (4,0 x 3,0 mm). Fase móvel: água e ácido fórmico 0,05% (Solvente A) e acetonitrila e ácido fórmico 0,05% (Solvente B). Vazão de 1 mL/min; temperatura da coluna de 35 °C; modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Plasma humano	20 min (t _R 10,0 min)	BAIETTO et al., 2010

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de daptomicina

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Tempo de corrida aproximado	Referência
CLAE	Coluna analítica Phenomenex Synergy C ₁₈ (50 x 4,6 mm; 4 µm), com pré-coluna C ₁₈ . Fase móvel: água contendo 0,01% de ácido fórmico (Solução A) e acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico (Solução B). Vazão de 0,4 mL/min; temperatura da coluna de 50 ± 4 °C; modo gradiente.	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Fluido peritoneal, plasma sanguíneo e urina humanos	13 min	GIKA et al., 2010
CLUE	Coluna analítica Acquity C ₁₈ BEH (100 x 2,1 mm; 1,7 µm) com pré-coluna Waters VanGuard constituída pelo mesmo material. Fase móvel: solução aquosa de TFA 0,1% (Solvente A) e metanol (Solvente B). Vazão de 0,45 mL/min; temperatura da coluna de 40 °C; modo gradiente.	UV em 220 nm	Plasma de coelhos	2,5 min (_{tr} 2,2 min)	GIKAS et al., 2010a
CLUE	Coluna analítica Acquity C ₁₈ BEH (100 x 2,1 mm; 1,7 µm) com pré-coluna Waters VanGuard constituída pelo mesmo material. Fase móvel: solução aquosa de TFA 0,1% (Solvente A) e metanol (Solvente B). Vazão de 0,5 mL/min; temperatura da coluna de 40 °C; modo gradiente.	UV em 220 nm	Plasma de coelhos	4,5 min (_{tr} 1,9 min)	GIKAS et al., 2010b
CLAE	Coluna analítica Zorbax RX-C ₈ (150 x 2,1 mm), com pré-coluna Nucleosil C ₈ . Fase móvel: solução aquosa de ácido fórmico 0,08% (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B). Vazão de 0,3 mL/min; temperatura da coluna de 40 °C; modo gradiente de eluição.	UV em 219 nm	Sangue humano	23 min	OLSZOWY et al., 2010

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação)- Métodos de análise descritos na literatura para a determinação de daptomicina

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Tempo de corrida aproximado	Referência
CLAE	Coluna analítica BDS C ₈ Hypersil (250 x 4,6 mm; 5 µm). Fase móvel: tampão fosfato de amônio 40 mM pH 4.0: acetonitrila (70:30, v/v). Vazão de 1,5 mL/min; modo isocrático.	UV em 214 nm	Plasma humano	20 min (t _R 17,4 min)	POLILLO et al., 2010
CLAE	Coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-C ₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm) protegida por sistema SecurityGuard (Phenomenex) equipado com elemento filtrante C ₈ (4,0 x 3,0 mm). Fase móvel: mistura de solução tampão (constituída por TFA 20 mM e trietilamina 15 mM, pH próximo a 3,5) e acetonitrila. Vazão de 1 mL/min; temperatura da coluna de 30 °C; modo gradiente.	UV em 224 nm	Plasma humano	11 min (t _R 9,2 min)	MARTENS-LOBENHOFFER et al., 2009
CLAE	Coluna analítica Hypersil 5 C ₁₈ (100 x 4,6 mm) com pré-coluna constituída pelo mesmo material. Fase móvel: tampão fosfato 0,2 M pH 5,5 e acetonitrila. Vazão de 1,5 mL/min.	UV em 223 nm	Soro humano	t _R 5,0 min	TOBIN et al., 2008

¹ N.D.: não descrito

3.3. Garantia da qualidade

O termo “qualidade”, dependendo do contexto em que se encontra, pode apresentar diferentes definições. Do ponto de vista do consumidor, a qualidade de um produto pode ser definida como sua condição de adequação ao uso, ou seja, o produto deve abranger as características de qualidade que o consumidor espera encontrar. Quando esta definição é transferida para o contexto farmacêutico, as características primordiais que o consumidor espera encontrar em um medicamento são a eficácia terapêutica e a segurança, ao lado de características menos essenciais, tais como a beleza do produto e propriedades organolépticas agradáveis (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

A qualidade dos produtos farmacêuticos tem sido uma preocupação da Organização Mundial da Saúde (OMS) desde a sua criação, em 1948. Segundo esta organização, sem a garantia de que os medicamentos comercializados são relevantes para as necessidades prioritárias de saúde e que atendam padrões aceitáveis de qualidade, segurança e eficácia, qualquer serviço de saúde é evidentemente comprometido. Além disso, todo governo destina uma parte substancial do seu orçamento total de saúde aos medicamentos e esta proporção tende a ser maior nos países em desenvolvimento, onde pode-se exceder 40%. Por todos os riscos que medicamentos de má qualidade podem oferecer à saúde da população e considerando os altos gastos de um governo com estes produtos, é essencial que um sistema confiável de controle de qualidade de medicamentos seja trazido ao alcance de todos os países (WHO, 2007).

Segundo a legislação brasileira, a qualidade dos medicamentos é de responsabilidade do fabricante, que deve assegurar que tais produtos estejam adequados ao uso pretendido, cumpram com os requisitos estabelecidos em seu registro e não coloquem os pacientes em risco por não apresentarem segurança, qualidade ou eficácia adequadas. Para que o objetivo de qualidade seja atingido de forma confiável, é indispensável que haja a participação e o compromisso de todos os funcionários da empresa, além da necessidade de um sistema da Garantia da Qualidade bem estruturado, que incorpore as Boas Práticas de Fabricação (BPF) (BRASIL, 2010).

A “Garantia da Qualidade”, de modo geral, compreende todas as questões que, individual ou coletivamente, influenciam a qualidade de um produto farmacêutico. Envolve todas as providências tomadas com o objetivo de garantir que os medicamentos cumpram com

seus requisitos de qualidade e possam ser usados para os fins propostos (WHO, 2007; BRASIL, 2010).

As “Boas Práticas de Fabricação” constituem um importante elemento da Garantia da Qualidade e têm como objetivo assegurar que os produtos sejam rigorosamente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro. O seu cumprimento faz com que os riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica, tais como a contaminação cruzada, contaminação por partículas, troca ou mistura do produto, sejam minimizados (BRASIL, 2010).

O “Controle de Qualidade”, por sua vez, também faz parte da Garantia da Qualidade e é o conjunto de medidas que tem como meta garantir, a qualquer momento, a produção de lotes de medicamentos e demais produtos que satisfaçam às normas de identidade, atividade, teor, pureza, eficácia e inocuidade (FB, 2010). É função do Controle de Qualidade verificar se o produto está em conformidade com as especificações (ICH, 2000).

Para que a qualidade de um medicamento seja monitorada de maneira adequada e confiável dentro do Controle de Qualidade da indústria farmacêutica, são necessários métodos analíticos eficazes e confiáveis para este propósito (PARISOTTO et al., 2005). Por tal motivo, o desenvolvimento de métodos analíticos vem sendo cada vez mais objeto de atenção e de inúmeras pesquisas realizadas mundialmente, as quais são fundamentais e altamente relevantes para otimizar a análise dos medicamentos na indústria e garantir a qualidade dos produtos já comercializados.

3.4. Validação de métodos analíticos

Considerando os riscos que produtos farmacêuticos de má qualidade podem exercer sobre a saúde da população e o impacto negativo à reputação de uma indústria farmacêutica, é de fundamental importância que o Controle de Qualidade conte com métodos analíticos eficazes e totalmente confiáveis para monitorar a qualidade do medicamento produzido antes que ele seja comercializado. Assim, a necessidade de se comprovar também a qualidade dos métodos analíticos utilizados durante e depois da fabricação dos medicamentos tornou-se fundamental (LA ROCA et al., 2007). Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004).

O objetivo da validação de métodos analíticos é demonstrar que o método é adequado para a finalidade pretendida (FDA, 2000; ICH, 2005; USP 37, 2014; INMETRO, 2011).

Assim, através de resultados experimentais, a validação deve garantir que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). A validação deve ser o resultado de um processo bem organizado, bem planejado e sistematicamente executado, o qual inclui o desenvolvimento do método analítico, estudos de pré-validação e, finalmente, a validação propriamente dita (BLIESNER, 2006).

Para a validação de metodologias analíticas não descritas em farmacopeias ou formulários oficiais, algumas características analíticas típicas devem ser consideradas, tais como: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez. Estes parâmetros podem ser exigidos ou não, de acordo com as características da análise (FDA, 2000; BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014; INMETRO, 2011). A conformidade do sistema é outro parâmetro utilizado para a validação de métodos cromatográficos (FDA, 1994; ICH, 2005; USP 37, 2014).

Os métodos analíticos podem ser classificados em quatro categorias, segundo sua finalidade (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014):

- **Categoria I** – Testes quantitativos para a determinação da substância ativa em produtos farmacêuticos ou matérias primas.
- **Categoria II** – Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias primas.
- **Categoria III** – Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).
- **Categoria IV** – Testes de identificação.

Para cada categoria de métodos analíticos é exigido um conjunto de testes, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3- Testes exigidos para cada categoria de métodos analíticos (BRASIL, 2003)

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Não	Não	Não
	Intermediária	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária

A especificidade é a capacidade de um método analítico em avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes que normalmente podem estar presentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ICH, 2005). Alguns órgãos internacionais, tais como a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), optam pelo termo “seletividade” para esta definição, reservando o termo “especificidade” para procedimentos completamente seletivos (USP 37, 2014). Durante a validação de um método indicativo de estabilidade, é necessário demonstrar a especificidade/seletividade do método (BLESSY et al., 2013). 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, 2007).

Linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma determinada faixa de aplicação (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Intervalo é a faixa compreendida entre os limites de quantificação superior e inferior, para a qual tenham sido demonstrados níveis adequados de precisão, exatidão e linearidade (BRASIL, 2003; ICH, 2005, USP 37, 2014).

Precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). As três formas mais comuns de expressar a precisão são: por meio da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão relativo (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005, USP 37, 2014). A repetibilidade (precisão intradia) refere-se ao uso de procedimentos analíticos num curto período de tempo com os mesmos analistas e os mesmos equipamentos (BRASIL, 2003). A precisão intermediária (precisão interdias) refere-se à avaliação da precisão sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas variando uma ou mais condições específicas, as quais podem ser: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes dias (INMETRO, 2011). Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial), por sua vez, trata-se da concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, comumente aplicados à padronização da metodologia analítica (BRASIL, 2003).

Limite de detecção é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições analíticas estabelecidas

(BRASIL, 2003; USP 37, 2014). Limite de quantificação, por sua vez, é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão adequadas, sob as condições analíticas estabelecidas (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014).

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados por ele obtidos comparados ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014). Existem várias formas de se calcular a exatidão, dependendo do objetivo da análise:

- a) **Análise de fármacos:** a exatidão pode ser avaliada aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou ainda comparando-se os resultados obtidos com aqueles resultantes de um segundo método bem caracterizado, cuja exatidão tenha sido estabelecida (BRASIL, 2003; USP 37, 2014).
- b) **Análise de formas farmacêuticas:** a exatidão pode ser estudada através de placebo contaminado, em que quantidade conhecida de fármaco é adicionada a uma mistura contendo os adjuvantes do medicamento, ou pelo método de adição de padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento (BRASIL, 2003; USP 37, 2014). Ainda é possível comparar os resultados obtidos com um segundo procedimento bem caracterizado (USP 37, 2014).
- c) **Análise de impurezas:** a exatidão deve ser obtida pelo método de adição de padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco. Pode-se também comparar os resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (BRASIL, 2003; USP 37, 2014).

Robustez é a medida da capacidade que um método analítico tem de permanecer inalterado frente a pequenas e deliberadas variações nos parâmetros analíticos (USP 37, 2014).

Os guias do *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) (2005) estabelecem como parte do processo de validação de sistemas cromatográficos o teste de conformidade do sistema. Trata-se de uma etapa essencial, pois assegura que os parâmetros cromatográficos selecionados para a análise estejam aptos a fornecer resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis (PASCHOAL et al., 2008). Com este propósito, alguns parâmetros devem ser analisados a

partir do pico cromatográfico, tais como o tempo de retenção (t_R), o número de pratos (N) e os fatores de cauda (FC), de assimetria (A_S) e de retenção (k).

O tempo de retenção representa o tempo gasto desde a injeção no sistema cromatográfico até a saída do ponto máximo do pico referente ao analito (PASCHOAL et al., 2008). O número de pratos é uma medida da eficiência da coluna cromatográfica (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Os fatores de cauda e de assimetria medem a simetria e as distorções frontais ou posteriores (caudas) de um pico cromatográfico. O fator de retenção mede a localização do pico de interesse em relação ao tempo de retenção do composto não-retido (FDA, 1994).

A estatística é uma ferramenta essencial para avaliação dos resultados gerados no processo de validação. Ferramentas como a análise de variância (ANOVA), o teste t Student, entre outros, são muito utilizadas para dar fundamento científico-matemático aos resultados obtidos (LA ROCA et al., 2007).

3.5. Química Analítica Verde

De acordo com a Lei 6938, de 31 de agosto de 1981, mais conhecida como Lei da Política Nacional do Meio Ambiente, o poluidor é responsável por recuperar ou indenizar os danos ambientais ou a terceiros causados por ele, independentemente da existência de culpa. Em outras palavras, quem gera os resíduos torna-se responsável por eles (BRASIL, 1981). A Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011 complementa esta ideia quando diz que os responsáveis pelas fontes poluidoras dos recursos hídricos devem controlar e monitorar seus efluentes, devendo realizar um automonitoramento periódico (BRASIL, 2011). Devido às razões mencionadas, o gerenciamento de resíduos gerados é fundamental e uma obrigação das indústrias químicas e farmacêuticas.

Grande atenção à preservação do meio ambiente ganhou força desde os anos 1970 e tem grande repercussão na sociedade. Assim, cada vez mais as indústrias buscam alternativas ambientalmente favoráveis em relação aos métodos analíticos e outros processos que seguem em sua rotina. Uma tendência é que estas empresas busquem adotar uma postura de redução, prevenção ou eliminação dos resíduos de processo. Quando a empresa adota esta conduta, diminuindo a poluição através da minimização dos resíduos gerados, ela opta por evitar ou minimizar a geração de resíduos ao invés de tratar o efluente gerado, o que pode ser uma opção além de ambientalmente, também economicamente vantajosa (SANSEVERINO, 2000).

A exigente opinião pública e a tendência ao consumo sustentável fizeram emergir os primeiros conceitos da Química Verde, na década de 1990. O principal conceito da Química Verde é a utilização de habilidades e conhecimentos químicos para reduzir ou eliminar o uso ou a geração de substâncias perigosas durante o planejamento, manufatura e aplicação de produtos químicos, de modo a minimizar ameaças à saúde dos operadores e ao meio ambiente (ANASTAS, 1999). Uma das áreas mais ativas da Pesquisa e Desenvolvimento em Química Verde é o desenvolvimento de metodologias analíticas. Novos métodos e técnicas que sejam capazes de reduzir e eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas em todas as etapas da análise química são os principais alvos da chamada Química Analítica Verde (ANASTAS, 1999; SANSEVERINO, 2000; NOLASCO; TAVARES; BENDASSOLLI, 2006; GUARDIA; ARMENTA, 2012). O conceito da Química Analítica Verde também se estende à análise de produtos farmacêuticos.

Anastas e Warner (1998) propuseram 12 princípios para a Química Verde, os quais foram adaptados por Galuszka, Migaszewski e Namiński (2013), para melhor satisfazerem a Química Analítica Verde. Desta forma, os 12 princípios da Química Analítica Verde são: 1) Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar a etapa do tratamento de amostras; 2) O tamanho e a quantidade das amostras devem ser os menores possíveis; 3) Análises *in situ* devem ser realizadas; 4) Integração de processos analíticos e operações deve ser realizada, já que promove a economia de energia elétrica e reduz o uso de reagentes; 5) Métodos automatizados e miniaturizados devem ser selecionados; 6) Derivatizações devem ser evitadas; 7) Geração de grandes volumes de resíduos analíticos devem ser evitados e o manejo correto destes resíduos deve ser previsto; 8) Métodos multi-analitos devem ser favoritos em relação a métodos que analisam um analito por vez; 9) O uso de energia elétrica deve ser minimizado; 10) Reagentes obtidos de fontes renováveis devem ser preferidos; 11) Reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos; 12) A segurança dos operadores deve ser aumentada.

Com tudo isso, a tendência é que as empresas se preocupem cada vez mais em reduzir os impactos da poluição que produzem, adotando ações ambientais (BORINELLI et al., 2010). Assim, a tendência é que os danos ao meio ambiente causados por estas empresas fiquem cada vez mais escassos e haja a preservação dos recursos naturais. No entanto, na literatura ainda existe uma lacuna em relação à publicação de trabalhos que descrevem métodos analíticos “verdes” para serem usados em substituição aos clássicos (GUARDIA,

ARMENTA, 2012). Por tais motivos, esta área deve ser explorada cada vez mais, indo ao encontro das necessidades globais.

Nota: A revisão bibliográfica deste trabalho gerou o artigo científico: TÓTOLI, E.G.; GARG, S.; SALGADO, H.R.N. Daptomycin: Physico-chemical, Analytical and Pharmacological Properties. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 37, p. 699-710, 2015.

4. DESCRIÇÃO

4.1. Descrição geral

Nome genérico: Daptomicina

Nome químico: *N*-decanoil-L-triptofil-L-asparaginil-L-aspartil-L-treonilglicil-L-ornil-L-aspartil-D-alanil-L-aspartilglicil-D-seril-*treo*-3-metil-L-glutamil-3-antraniloil-L-alanina 1.13-3.4-lactona (SWEETMAN, 2011)

Fórmula química: $C_{72}H_{101}N_{17}O_{26}$ (SWEETMAN, 2011)

Massa molecular: 1620,7 g/mol (SWEETMAN, 2011)

Valores de pKa: 3,0 (do ácido [2S,3R]-3-metilglutâmico), 5,3 (de três grupos de ácidos aspárticos), 0,8 (da amina aromática) e 10,0 (da amina alifática) (MUANGSIRI et al., 2005)

Número de registo no *Chemical Abstracts Service* (CAS): 103060-53-3 (MORETTO; MASTELARO, 2013)

Número de registo na Denominação Comum Brasileira (DCB): 02687 (MORETTO; MASTELARO, 2013)

Categoria: Antimicrobiano

Classe: Lipopeptídeo cíclico

4.2. Substância química de referência (SQR)

A substância química de referência utilizada neste trabalho foi a daptomicina, adquirida da empresa *Sequoia Research Products* (Pangbourne, Reino Unido), com teor especificado de 98% e identificada pelo número de controle 130201927d.

4.3. Amostra da forma farmacêutica do pó liofilizado para solução injetável

Para este trabalho, foram utilizadas amostras de daptomicina em pó liofilizado, frascos-ampola contendo 500 mg de daptomicina, sob o número de lote 150703FG e com o nome comercial Cubicin® (Novartis, McPherson, EUA). Cada frasco contém 500 mg daptomicina e o adjuvante hidróxido de sódio.

4.4. Diluente da forma farmacêutica

A reconstituição da daptomicina em pó liofilizado deve ser realizada em cloreto de sódio 0,9% (MERCK, 2016a).

4.5. Armazenamento e estabilidade da forma farmacêutica

O Cubicin[®] deve ser conservado sob refrigeração (temperatura entre 2 e 8 °C). Estudos de estabilidade mostraram que a solução reconstituída de daptomicina é estável no frasco por até 12 horas em temperatura ambiente e 48 horas sob refrigeração (2-8 °C). A solução diluída em bolsa de infusão também é estável por 12 horas em temperatura ambiente e 48 horas sob refrigeração (MERCK, 2016a).

5. ANÁLISE QUALITATIVA

5.1. Características físicas

5.1.1. Material e método

A amostra de daptomicina pó liofilizado para solução injetável, descrita no item 4.3 foi analisada quanto ao seu aspecto e cor.

5.1.2. Resultados e discussão

A amostra de pó liofilizado para solução injetável de daptomicina apresentou-se sob a forma de pó de coloração amarelo claro. Estas características condizem com as características preconizadas pelo fabricante, que diz que o aspecto físico da amostra deve ser a de pó liofilizado de coloração amarelo claro a marrom claro (MERCK, 2016a).

5.2. Determinação do ponto de fusão

Ponto de fusão é a temperatura na qual uma substância se encontra completamente fundida (FB, 2010). Trata-se de um método muito empregado como indicativo de pureza de substâncias, visto que uma pequena quantidade de impureza pode causar alterações no ponto de fusão de um determinado composto (GRAHAM, 1995).

5.2.1. Material e método

O ponto de fusão foi determinado pelo método capilar para a daptomicina SQR, descrita no item 4.2, e também para a amostra de pó liofilizado para solução injetável, descrita no item 4.3. A substância foi introduzida e compactada em capilares com 7,5 cm de comprimento e 1,6 mm de diâmetro de modo a formar uma coluna de aproximadamente 3 a 4 cm de altura. A análise foi realizada em equipamento automático de ponto de fusão Stuart Scientific SMP3 (Staffordshire, Reino Unido), no qual os capilares contendo o fármaco são inseridos verticalmente. Foi realizada apenas uma análise para a daptomicina SQR e uma para a amostra, sendo que cada análise foi composta pela determinação simultânea de três capilares. O ponto de fusão foi verificado visualmente.

5.2.2. Resultados e discussão

Na análise do ponto de fusão da daptomicina SQR, foi observado que a substância se fundiu completamente em aproximadamente 206 °C. A coloração da substância dentro do capilar permaneceu a mesma durante todo o procedimento, sem qualquer variação de cor após sua fusão. Não foi encontrado o ponto de fusão da daptomicina descrito na literatura até o momento.

Quanto à análise da amostra de pó liofilizado, não foi observada a fusão da substância, apenas uma mudança de coloração, que ocorreu em temperatura próxima a 210 °C. Esta mudança de cor foi progressiva até atingir coloração marrom-escura. A diferença no comportamento entre a daptomicina SQR e amostra já era esperada, visto que a amostra de daptomicina apresenta o hidróxido de sódio como adjuvante na sua formulação, então a daptomicina não estava pura. Sabe-se que uma pequena quantidade de impureza pode causar alterações no ponto de fusão de um determinado composto (GRAHAM, 1995).

5.3. Cromatografia em camada delgada (CCD) indicativa de estabilidade

5.3.1. Considerações gerais

A técnica de CCD é baseada na separação dos componentes de uma mistura por meio da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre a superfície plana, sendo uma técnica amplamente empregada em laboratórios que envolvem a análise de substâncias orgânicas e organometálicas. A ampla utilização da técnica de CCD é consequência de suas inúmeras vantagens, tais como o fato de ser uma técnica de fácil execução e compreensão, permitir separações em breve espaço de tempo, ser versátil e altamente reproduzível, além de apresentar baixo custo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997). Além disso, o grande número de combinações de fases móveis e fases estacionárias favorece sua ampla aplicação e a torna uma técnica muito versátil (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Até o momento, não há na literatura trabalhos que descrevam o desenvolvimento desta técnica para a análise da daptomicina. Assim, o objetivo desta etapa do trabalho foi desenvolver um método de CCD, prático, confiável e indicativo de estabilidade, para auxiliar na identificação da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável e na detecção de possíveis produtos de degradação.

5.3.2. Material e método

5.3.2.1. Ensaios preliminares e desenvolvimento do método de CCD

5.3.2.1.1. Material

Durante os ensaios preliminares e desenvolvimento do método, foram utilizadas como fase estacionária placas de alumínio impregnadas com sílica-gel DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL C/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), com dimensões de 10,0 x 5,0 cm. Estas placas foram ativadas em estufa a 105 °C por 30 minutos antes do uso. Etanol (Synth, Diadema, Brasil) e metanol (Synth, Diadema, Brasil) grau analítico foram utilizados nas diversas composições de fases móveis testadas durante o desenvolvimento do método. Além disso, foi utilizada água purificada (obtida por osmose reversa - Millipore, Billerica, EUA). Quando necessário, o pH das fases móveis foi ajustado com solução preparada a partir de hidróxido de sódio grau analítico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) ou solução de ácido acético glacial grau analítico (Merck, Alemanha), com auxílio de aparelho medidor de pH modelo B474 (Micronal, São Paulo, Brasil). As soluções de trabalho foram aplicadas nas placas de CCD com auxílio de uma microsseringa de vidro (Hamilton®, Nevada, EUA). As pesagens foram realizadas em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo®, Barueri, Brasil). A daptomicina SQR e as amostras de pó liofilizado utilizadas foram descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. A revelação das manchas foi realizada por meio de câmara de luz UV no comprimento de onda de 365 nm. Foram utilizados outros materiais, tais como: cuba de CCD de vidro, estufa da marca Fanem (São Paulo, Brasil) e micropipetador modelo 20-200 µL (Digipet, Curitiba, Brasil).

5.3.2.1.2. Preparo da solução de daptomicina SQR

As soluções de daptomicina SQR foram preparadas na concentração de 1000 µg/mL. Para isso, foi pesado o equivalente a 5,0 mg de daptomicina SQR (descrita no item 4.2) e transferido para balão volumétrico de 5 mL. O volume do balão volumétrico foi completado com água purificada e em seguida a solução foi adequadamente homogeneizada.

5.3.2.1.3. Preparo da solução de daptomicina amostra

5.3.2.1.3.1. Verificação do peso médio e preparo de um *pool* de amostras

Antes do preparo da solução amostra de daptomicina, foi necessário verificar o peso médio das ampolas de pó liofilizado para se calcular a massa de amostra a ser pesada.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (FB, 2010), este ensaio deve ser realizado com 20 unidades quando se trata da forma farmacêutica de pó liofilizado. No entanto, foi realizado com apenas 3 frascos-ampola de daptomicina (descritos no item 4.3) devido ao seu alto custo de aquisição, o qual permitiu a compra de número limitado de frascos.

O lacre metálico e o rótulo de cada frasco-ampola foram removidos. As três unidades foram pesadas individualmente, com as respectivas tampas de borracha. Depois disso, os conteúdos dos três frascos foram removidos e transferidos para um único recipiente, resultando em um *pool* de amostras. Os frascos-ampola vazios foram lavados com água e em seguida etanol, depois disso foram secos em estufa a 105 °C por 1 hora. Os frascos foram resfriados à temperatura ambiente, em seguida as tampas de borracha foram recolocadas e os frascos foram pesados individualmente. A diferença entre as pesagens com os frascos cheios e vazios representou o peso do conteúdo.

O peso médio calculado dos frascos foi igual a 0,54305 g, sendo 0,500 g referente à daptomicina e 0,04305 g ao excipiente (hidróxido de sódio). Desta forma, a daptomicina está presente no *pool* de amostras em concentração de 92,07% e o hidróxido de sódio está presente em uma concentração de 7,93%.

5.3.2.1.3.2. Preparo da solução de daptomicina amostra

As soluções de daptomicina amostra de pó liofilizado foram preparadas na concentração de 1000 µg/mL. Para isso, a partir do *pool* de amostras descrito no item 5.3.2.1.3.1, o equivalente a 5,0 mg de daptomicina foi analiticamente pesado e transferido para balão volumétrico de 5 mL. O volume do balão foi completado com água purificada e em seguida a solução foi adequadamente homogeneizada.

5.3.2.1.4. Ensaios preliminares e desenvolvimento do método de CCD

Durante o desenvolvimento do método de CCD, foram testadas 7 fases móveis, as quais serão descritas a seguir:

- **Sistema 1:** água : etanol (10:90, v/v)
- **Sistema 2:** água : etanol, pH 8,0 (ajustado com solução de hidróxido de sódio 1 M) (10:90, v/v)
- **Sistema 3:** água : etanol, pH 3,5 (ajustado com solução de ácido acético glacial) (10:90, v/v)
- **Sistema 4:** água : metanol (10:90, v/v)
- **Sistema 5:** água : metanol, pH 8,0 (ajustado com solução de hidróxido de sódio 1 M) (10:90, v/v)
- **Sistema 6:** água : metanol pH 8,0 (ajustado com solução de hidróxido de sódio 1 M) (15:85, v/v)
- **Sistema 7:** água : metanol, pH 8,0 (ajustado com solução de hidróxido de sódio 1 M) (20:80, v/v)

Para a execução do ensaio, a fase móvel, após preparada, foi transferida para cuba de vidro e depois foi esperado até sua saturação, por um período de aproximadamente 30 minutos. As soluções de daptomicina SQR e amostra foram aplicadas em um volume de 10 µL diretamente na placa de sílica previamente ativada, com auxílio de microseringa de vidro. Depois disso, a placa foi colocada dentro da cuba para a eluição dos compostos. Quando a fase móvel atingiu o percurso de 8 cm, a placa foi retirada da cuba de vidro, para secagem, e depois foi realizada a revelação das manchas por meio da observação das placas secas em câmara de luz UV em 365 nm. As manchas foram observadas quanto à forma, posição, tamanho e cor. Além disso, foram determinados os fatores de retenção (R_f) referentes às manchas correspondentes à daptomicina SRQ e amostra, por meio da Equação 1 (COLLINS, BRAGA, BONATO, 1997).

$$R_f = \frac{d_r}{d_m}$$

Equação 1

Em que:

d_r = distância percorrida pelo analito

d_m = distância percorrida pela fase móvel

5.3.2.2. Seletividade e estudo de degradação forçada

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2003) e os guias do ICH (2005), para se validar um método de identificação, o único parâmetro de validação que é exigido é a seletividade, conforme mostrado na Tabela 3.

Desta maneira, para validar o método de CCD desenvolvido, a seletividade foi demonstrada de duas maneiras: na primeira, mostrando que o excipiente presente na forma farmacêutica de pó liofilizado não interfere na análise da daptomicina; na segunda, submetendo a amostra de daptomicina a condições forçadas de estresse e demonstrando que os produtos de degradação formados também não interferem com a análise do fármaco.

5.3.2.2.1. Material

Além do material descrito no item 5.3.2.1.1, também foram utilizados os seguintes materiais: ácido clorídrico (HCl) (Qhemis, São Paulo, Brasil), hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,3% (Impex, Varginha, Brasil) e câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm) com lâmpada UVC (254 nm) 20 W, para os ensaios de seletividade e estudo de degradação forçada da amostra de daptomicina.

5.3.2.2.2. Análise da interferência do excipiente

Para a análise da seletividade do método em relação ao excipiente, foi preparada solução de daptomicina SQR, conforme descrito no item 5.3.2.1.2, e também uma solução de placebo, contendo apenas o hidróxido de sódio (único adjuvante presente na forma farmacêutica de pó liofilizado).

Para o preparo da solução de placebo, foi pesado 8,6 mg de hidróxido de sódio e transferido para balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão volumétrico foi completado com água purificada e em seguida a solução foi adequadamente homogeneizada, resultando em uma solução de 86 µg/mL de hidróxido de sódio. Esta concentração de hidróxido de sódio é a mesma que teria em uma solução de amostra de daptomicina em pó liofilizado na concentração de 1000 µg/mL.

Depois disso, foi realizada uma análise de CCD conforme descrito no item 5.3.2.1.4, com fase móvel constituída por água : metanol (10:90, v/v) e fase estacionária placas DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL C/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Na placa

de CCD foram aplicadas as soluções de daptomicina SRQ e de placebo, lado a lado. Depois disso, foi observado se o placebo gerou alguma mancha que pudesse interferir na análise da daptomicina, comparando com a mancha gerada pela SQR.

5.3.2.2.3. Estudo de degradação forçada

Soluções de amostra de daptomicina (1000 µg/mL) foram submetidas à degradação forçada por condições ácida, alcalina, aquosa, oxidativa e fotolítica, com os objetivos de avaliar se o sistema cromatográfico escolhido é capaz de detectar a degradação da daptomicina na forma farmacêutica de pó para solução injetável, revelar a presença de possíveis produtos de degradação e demonstrar que estes produtos não interferem na análise da daptomicina, demonstrando a seletividade do método.

A solução amostra foi preparada em HCl 0,01 M e NaOH 0,001 M para as hidrólises ácida e alcalina, respectivamente. As amostras foram aquecidas a 60 °C. A degradação aquosa foi realizada através da exposição de solução aquosa da amostra à temperatura de 60 °C, em banho-maria. Para a degradação oxidativa, a solução amostra foi preparada em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% (p/v) e depois foi submetida à temperatura de 60 °C. A fotodegradação foi induzida através da exposição de uma solução aquosa da amostra à luz ultravioleta, utilizando câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC (254 nm) 20 W.

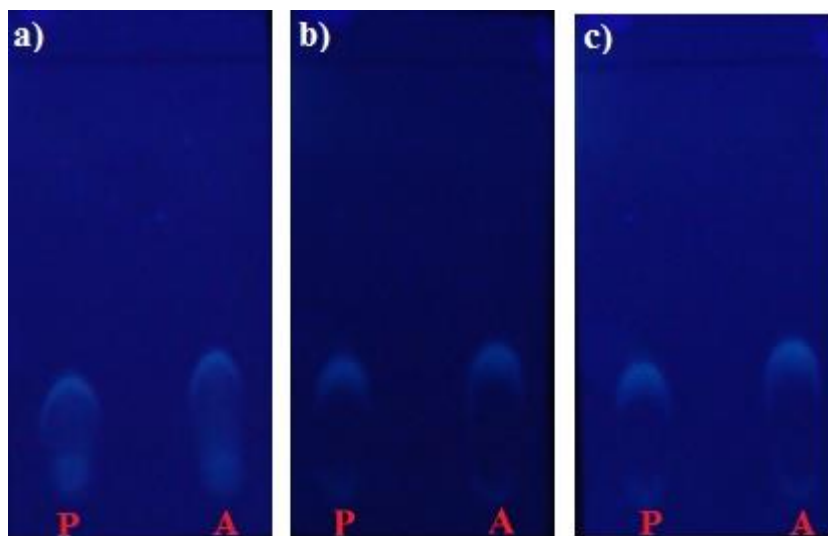
Todas as amostras foram submetidas à análise por CCD com a fase móvel constituída por água : metanol (10:90, v/v) nos tempos de 0; 0,25; 0,50; 1,5; 3; 6; 24 e 48 horas. As placas utilizadas foram DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL C/UV₂₅₄, com as dimensões de 10,0 x 10,0 cm, previamente ativadas em estufa a 105 °C por 30 minutos. A revelação das manchas foi realizada em câmara de luz UV em 365 nm.

5.3.3. Resultados e discussão

5.3.3.1. Ensaios preliminares e desenvolvimento do método de CCD

Durante os ensaios realizados, foi observado que nenhuma fase móvel testada contendo o etanol como a fase orgânica obteve resultados satisfatórios (Sistemas 1, 2 e 3). Em todos os casos houve a formação de rastros nos cromatogramas, como o demonstrado na Figura 3.

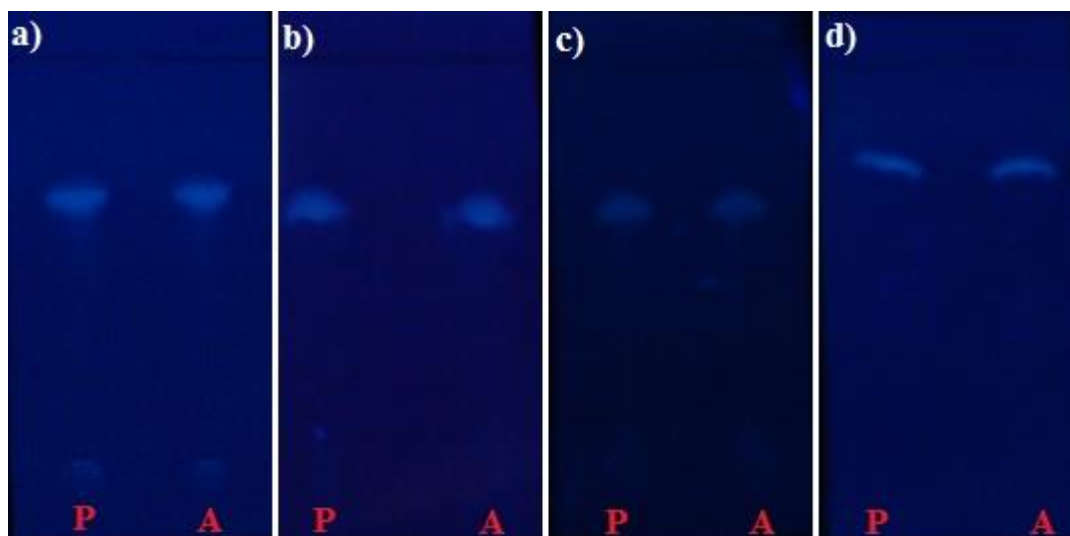
Figura 3- Cromatogramas obtidos com os Sistemas 1, 2 e 3 durante desenvolvimento de método de CCD para análise da daptomicina em pó liofilizado. a) Sistema 1: água : etanol (10:90, v/v); b) Sistema 2: água : etanol, pH 8,0 (ajustado com solução de hidróxido de sódio 1 M) (10:90, v/v); c) Sistema 3: água : etanol, pH 3,5 (ajustado com solução de ácido acético glacial) (10:90, v/v). Fase estacionária: DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL C/UV₂₅₄. Revelação: câmara de luz UV em 365 nm. P: Daptomicina SQR (1000 µg/mL). A: Amostra de daptomicina pó para solução injetável (1000 µg/mL).



Nestes três sistemas, a amostra migrou, mas não de modo homogêneo, espalhando-se pela placa. Além disso, o tempo que a fase móvel demorou para eluir em todos os sistemas testados foi superior a 50 minutos, tempo considerado alto e que tornaria o método inadequado para análises rápidas de rotina do controle de qualidade deste fármaco.

A Figura 4 apresenta os cromatogramas obtidos através dos Sistemas 4, 5, 6 e 7, os quais empregaram o metanol como a fase orgânica das fases móveis.

Figura 4- Cromatogramas obtidos com os Sistemas 4, 5, 6 e 7 durante desenvolvimento de método de CCD para análise da daptomicina em pó liofilizado. a) Sistema 4: água : metanol (10:90, v/v); b) Sistema 5: água : metanol, pH 8,0 (ajustado com solução de hidróxido de sódio 1 M) (10:90, v/v); c) Sistema 6: água : metanol, pH 8,0 (ajustado com solução de hidróxido de sódio 1 M) (15:85, v/v); d) Sistema 7: água : metanol, pH 8,0 (ajustado com solução de hidróxido de sódio 1 M) (20:80, v/v). Fase estacionária: DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL C/UV₂₅₄. Revelação: câmara de luz UV em 365 nm. P: Daptomicina SQR (1000 µg/mL). A: Amostra de daptomicina pó para solução injetável (1000 µg/mL).



Os Sistemas 4, 5, 6 e 7 se mostraram adequados para a análise da daptomicina da forma farmacêutica, diferindo-se apenas pelos valores de R_f calculados. Além disso, a eluição das fases móveis ocorreu de maneira mais rápida em comparação aos Sistemas 1, 2 e 3. O tempo foi menor que 25 minutos em todos os casos.

O Sistema 4 [água : metanol a (10:90, v/v)] e o Sistema 5 [água : metanol, pH 8,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio 1 M (10:90, v/v)] apresentaram valores de R_f muito parecidos, em média 0,64. Isto mostra que o ajuste de pH foi irrelevante neste quesito. O Sistema 6 [água : metanol, pH 8,0, ajustado com solução de hidróxido de sódio 1 M (15:85, v/v)] apresentou valor de R_f um pouco mais elevado, de 0,66. O Sistema 7 [água : metanol, pH 8,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio 1 M (20:80, v/v)] exibiu valor de R_f ainda mais elevado, de 0,72.

Em todos os casos em que o metanol foi utilizado como a fase orgânica da fase móvel, as manchas referentes à daptomicina SQR e amostra se apresentaram bem delimitadas e com a ausência de rastros, além dos valores de R_f calculados serem adequados. No entanto, a fase

móvel escolhida como a melhor opção foi a do Sistema 4. O principal motivo para isso é o fato de ser a fase móvel mais fácil de ser preparada entre elas, já que não é necessário seu ajuste de pH, ao contrário dos Sistemas 5, 6 e 7. Este fato permite maior agilidade às análises de rotina do controle de qualidade, já que o preparo da fase móvel é mais simples e demanda menor tempo. Além disso, entre elas, é a fase móvel de menor custo, já que não requer a solução de hidróxido de sódio para o seu preparo. Assim, o método por CCD desenvolvido demonstrou ser adequado para auxiliar a identificação de daptomicina na forma farmacêutica.

5.3.3.2. Seletividade e estudo de degradação forçada

5.3.3.2.1. Análise da interferência do excipiente

Seletividade é a capacidade de um método analítico em avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes que normalmente podem estar presentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ICH, 2005). Desta forma, uma eventual interferência dos adjuvantes que compõem o excipiente de uma forma farmacêutica poderia tornar um método não-seletivo. Por tal motivo, foi realizado um ensaio para verificar uma eventual interferência do hidróxido de sódio, único adjuvante presente na forma farmacêutica de daptomicina em pó para solução injetável, nas análises de CCD realizadas pelo método desenvolvido. A Figura 5 apresenta o cromatograma obtido na análise do excipiente. O ensaio foi realizado utilizando como fase móvel água : metanol (10:90 v/v) e fase estacionária DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL C/UV₂₅₄.

Figura 5- Cromatograma obtido na análise do excipiente da amostra de daptomicina em pó para solução injetável durante desenvolvimento de método de CCD para análise da daptomicina em pó liofilizado. Fase estacionária: DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL C/UV₂₅₄. Revelação: câmara de luz UV em 365 nm. Fase móvel: água : metanol (10:90 v/v). P: daptomicina SQR. E: excipiente (hidróxido de sódio).



Como pode ser observado na Figura 5, nenhuma mancha foi formada a partir da solução de hidróxido de sódio. Desta maneira, não há nenhuma interferência do excipiente na análise da daptomicina na forma farmacêutica pelo método de CCD desenvolvido, o que mostra a seletividade do método.

5.3.3.2.2. Estudo de degradação forçada

A amostra de daptomicina em pó liofilizado foi submetida a condições forçadas de degradação, em meios ácido, alcalino, aquoso, oxidativo e fotolítico, com o objetivo de avaliar a capacidade do método desenvolvido de detectar a degradação da daptomicina na forma farmacêutica, além de verificar sua capacidade de revelar a presença produtos de degradação. Além disso, este ensaio teve como objetivo demonstrar que eventuais produtos de degradação formados não interferem na análise da daptomicina, reforçando a seletividade do método.

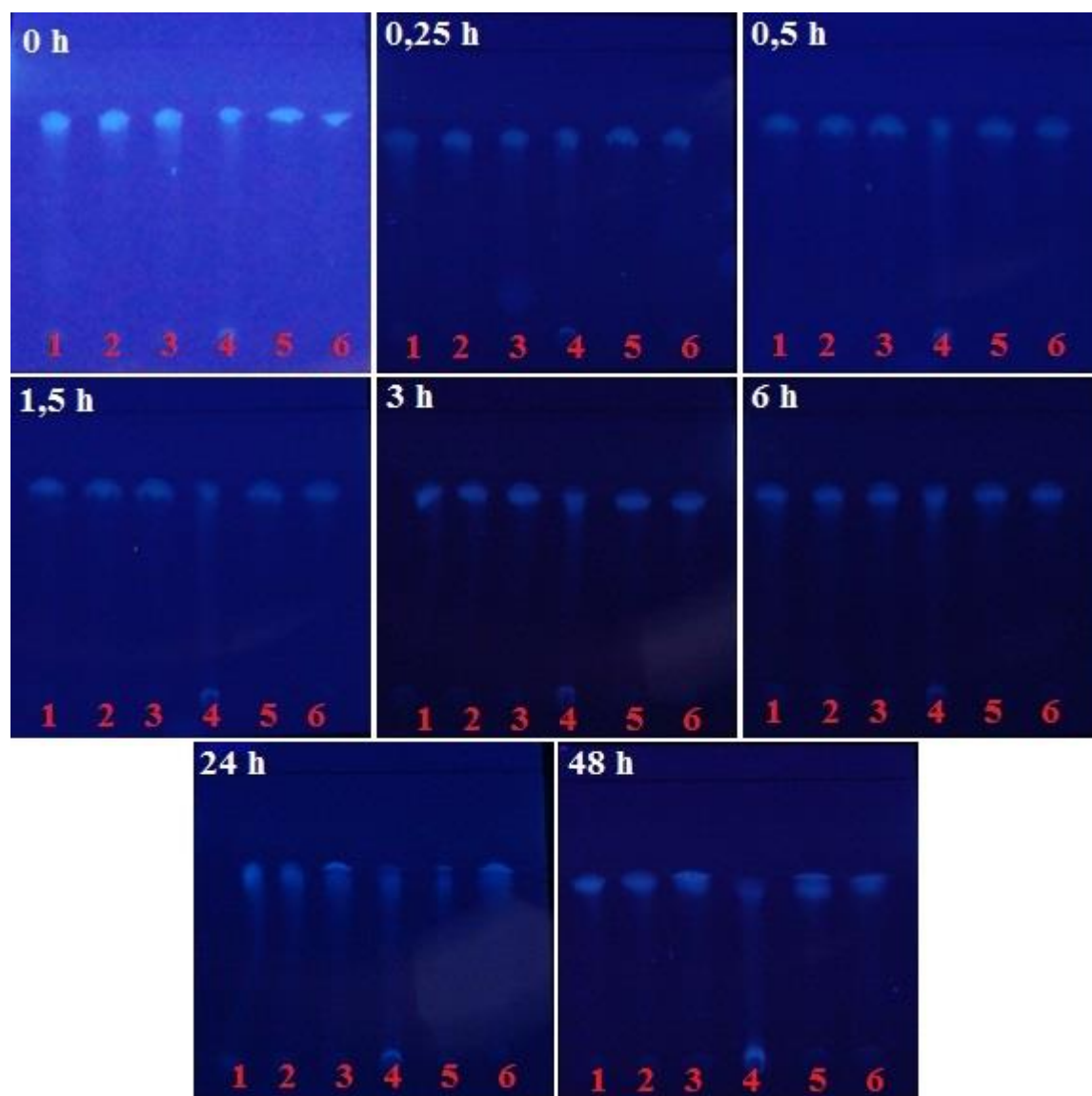
A Tabela 4 apresenta todos os dados obtidos na análise por CCD da degradação forçada da daptomicina em pó liofilizado para solução injetável. A Figura 6 mostra os cromatogramas referentes a esta análise.

Tabela 4- Análise por CCD da degradação forçada de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável

Tempo (h)	Degradação aquosa	Degradação fotolítica	Degradação ácida	Degradação alcalina	Degradação oxidativa
0,0	DPT ¹ : R _f = 0,64 Manchas extras: não apareceram	DPT: R _f = 0,64 Manchas extras: não apareceram	DPT: R _f = 0,64 Manchas extras: não apareceram	DPT: R _f = 0,64 Manchas extras: não apareceram	DPT: R _f = 0,64 Manchas extras: não apareceram
0,25	Idem tempo 0 h	Idem tempo 0 h	Idem tempo 0 h	Idem tempo 0 h	Idem tempo 0 h
0,5	Idem tempo 0 h	Idem tempo 0 h	A mancha da DPT ficou menor do que nas outras condições. O R _f permaneceu o mesmo.	Idem tempo 0 h	Idem tempo 0 h
1,5	Idem tempo 0 h	Idem tempo 0 h	Idem tempo 0,50 h	Idem tempo 0 h	Idem tempo 0 h
3,0	DPT: R _f = 0,65 Manchas extras: R _f = 0,70	Idem tempo 0 h	Idem tempo 0,50 h	DPT: R _f = 0,65 Manchas extras: R _f = 0,70	DPT: R _f = 0,65 Manchas extras: R _f = 0,70
6,0	DPT: R _f = 0,66 Manchas extras: R _f = 0,71	Idem tempo 0 h	A mancha da DPT está com intensidade de cor visivelmente menos intensa que nos tempos anteriores	DPT: R _f = 0,66 Manchas extras: R _f = 0,71	DPT: R _f = 0,66 Manchas extras: R _f = 0,71
24,0	DPT: R _f = 0,65 (intensidade fraca) Manchas extras: R _f = 0,69	Idem tempo 0 h	Idem tempo 6,0 h	DPT: R _f = 0,65 (intensidade fraca) Manchas extras: R _f = 0,69	DPT: R _f = 0,65 (intensidade fraca) Manchas extras: R _f = 0,69
48,0	DPT: R _f = 0,64 (intensidade fraca) Manchas extras: R _f = 0,68	Idem tempo 0 h	Idem tempo 6,0 h	DPT: R _f = 0,66 (intensidade fraca) Manchas extras: R _f = 0,68	DPT: R _f = 0,66 (intensidade fraca) Manchas extras: R _f = 0,68

¹ DPT: amostra de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável

Figura 6- Cromatogramas obtidos no estudo de degradação forçada da amostra de daptomicina em pó para solução injetável obtidos durante desenvolvimento de método de CCD para análise da daptomicina em pó liofilizado. Fase estacionária: DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL C/UV₂₅₄. Revelação: câmara de luz UV em 365 nm. Fase móvel: água : metanol (10:90 v/v). 1: daptomicina íntegra. 2: degradação fotolítica (luz UVC 254 nm). 3: degradação aquosa (H₂O, 60 °C). 4: degradação ácida (HCl 0,01 M, 60 °C). 5: degradação alcalina (NaOH 0,001 M, 60 °C). 6: degradação oxidativa (H₂O₂ 0,3%, 60 °C). Os tempos de análise estão descritos no alto à esquerda de cada cromatograma.



Através da análise dos dados obtidos, aparentemente a daptomicina foi mais estável em condições fotolíticas e menos estável em condições ácidas, nas quais, em apenas 0,50 h, foi possível perceber que o tamanho da mancha referente ao fármaco havia diminuído, sugerindo a ocorrência de degradação. Apenas uma mancha adicional foi detectada nos cromatogramas, sendo comum para as degradações aquosa, alcalina e oxidativa (com R_f de aproximadamente 0,70), a qual surgiu após 3 horas de degradação e permaneceu até a última análise, em 48 horas. A intensidade de cor das manchas referentes ao produto de degradação formado foi aumentando em cada análise subsequente realizada, ao passo que as manchas referentes à daptomicina foram apresentando intensidade mais fraca.

Vale ressaltar que as manchas extras que se formaram se encontravam separadas das manchas referentes ao fármaco nos cromatogramas, e isso indica que provavelmente não há interferência destes possíveis produtos de degradação na análise da daptomicina na amostra de pó liofilizado para solução injetável. Este fato mostra a seletividade do método, que é um parâmetro que deve ser demonstrado durante a validação de um método indicativo de estabilidade (BLESSY et al., 2013). Os resultados também mostraram a capacidade indicativa de estabilidade do método proposto, já que foi capaz de detectar a degradação da daptomicina e possíveis produtos de degradação. Assim sendo, o método de CCD desenvolvido pode ser aplicado para análise qualitativa da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável em ensaios de rotina do Controle de Qualidade deste fármaco.

5.4. Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

5.4.1. Considerações gerais

Diversas substâncias farmacêuticas podem ser identificadas por meio da análise de seu espectro de absorção na região do ultravioleta, cuja faixa de comprimento de onda no espectro eletromagnético se apresenta entre 200-400 nm. Para a identificação de compostos, deve ser feita uma comparação de espectro obtido frente ao espectro da substância química de referência (FB, 2010).

Empregando-se diferentes solventes (água, metanol, ácido clorídrico e hidróxido de sódio), esta etapa do trabalho teve como objetivo observar as bandas de absorção máxima da daptomicina, assim como a influência do pH em suas características de absorção, e a partir destes dados, escolher o melhor solvente para o desenvolvimento e validação de um método qualitativo de análise da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução

injetável por espectrofotometria no UV. Além disso, esta etapa do trabalho serviu como base para o desenvolvimento e validação de método quantitativo por espectrofotometria da região do UV, o qual será descrito posteriormente.

5.4.2. Material

Para a realização das análises, foi utilizado espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu® (Kyoto, Japão), modelo UV-1800, e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os solventes utilizados foram: água purificada (obtida por osmose reversa - Millipore, Billerica, EUA); metanol (Synth, Diadema, Brasil); solução de HCl 0,1 M, preparada a partir de solução concentrada de HCl (Qhemis, São Paulo, Brasil) e solução de NaOH 0,1 M, preparada a partir de NaOH (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). A daptomicina SQR e amostra de pó liofilizado para solução injetável utilizadas foram descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. Também foi utilizado micropipetador modelo 20-200 µL (Digipet, PR, Brasil).

5.4.3. Método

5.4.3.1. Análise da daptomicina SQR empregando diferentes solventes

Foram realizadas quatro pesagens do equivalente a 2,5 mg de daptomicina SQR. Estas massas foram transferidas para quatro balões volumétricos de 25 mL e os volumes foram completados com água, metanol, HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M, respectivamente, obtendo-se soluções de 100 µg/mL. Destas soluções, foram retiradas alíquotas de 1,2 mL, que foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, cujos volumes foram completados com os respectivos solventes, resultando em soluções de trabalho de 12 µg/mL. Os espectros de absorção da SQR foram registrados na faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm.

5.4.3.2. Análise da amostra de daptomicina e seletividade do método

Considerando que a água foi escolhida como solvente para o desenvolvimento do método qualitativo de análise da daptomicina na forma farmacêutica, foi preparada também uma solução aquosa da amostra de daptomicina em pó liofilizado na concentração de 12 µg/mL. Para isso, primeiramente foi verificado o peso médio de três frascos-ampola de daptomicina (descritos no item 4.3) e preparado um *pool* de amostras, conforme descrito no item 5.3.2.1.3.1. A partir deste *pool* de amostras, o equivalente a 2,5 mg de daptomicina foi analiticamente pesado e transferido para balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi

completado com água purificada e em seguida a solução foi adequadamente homogeneizada. Desta solução foi retirada uma alíquota de 1,2 mL, que em seguida foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, cujo volume foi completado com água purificada, resultando em uma solução com concentração teórica de 12 µg/mL. Esta solução foi analisada na região do UV (200 a 400 nm) e seu espectro de absorção foi comparado com o espectro obtido a partir da solução aquosa da daptomicina SQR.

Para verificar a seletividade do método, foi preparada uma solução de placebo, constituído apenas por NaOH, na mesma concentração que estaria na solução de 12 µg/mL de amostra de daptomicina em pó liofilizado. Para isso, foi pesada uma massa de 10 mg de hidróxido de sódio e transferida para balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado com água purificada. Em seguida a solução foi adequadamente homogeneizada, resultando em uma solução de 100 µg/mL de hidróxido de sódio. A partir desta solução, foi transferida uma alíquota de 0,103 mL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água purificada, obtendo-se solução de 1,03 µg/mL, mesma concentração de hidróxido de sódio que teria uma solução de 12 µg/mL de amostra de pó liofilizado de daptomicina. Esta solução foi analisada na região do UV (200 a 400 nm) e seu espectro de absorção foi comparado ao obtido com a solução aquosa da daptomicina SQR, para verificar se houve alguma interferência do excipiente na análise da daptomicina.

5.4.4. Resultados

5.4.4.1. Análise da daptomicina SQR empregando diferentes solventes

A Tabela 5 apresenta os comprimentos de onda de máxima absorção determinados para a daptomicina SQR e seus respectivos valores de absorvância, nos diferentes solventes testados.

Tabela 5- Comprimentos de onda de máxima absorção e seus respectivos valores de absorvância determinados para a daptomicina SQR (12 µg/mL) em diferentes solventes

Solvente	Comprimento de onda (nm)	Absorvância
Água purificada	221,0	0,390
Metanol	223,0	0,416
HCl 0,1 M	220,2	0,320
NaOH 0,1 M	223,6	0,350

Nas Figuras 7 e 8 são apresentados os espectros de daptomicina SQR nos diferentes solventes.

Figura 7- Espectro de absorção da solução de daptomicina SQR com concentração de 12 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando água como solvente.

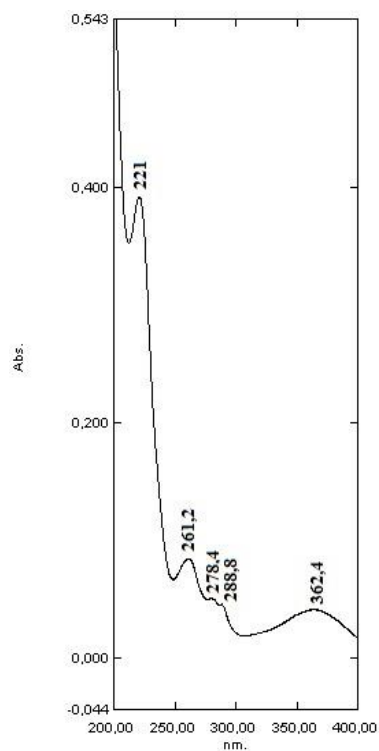
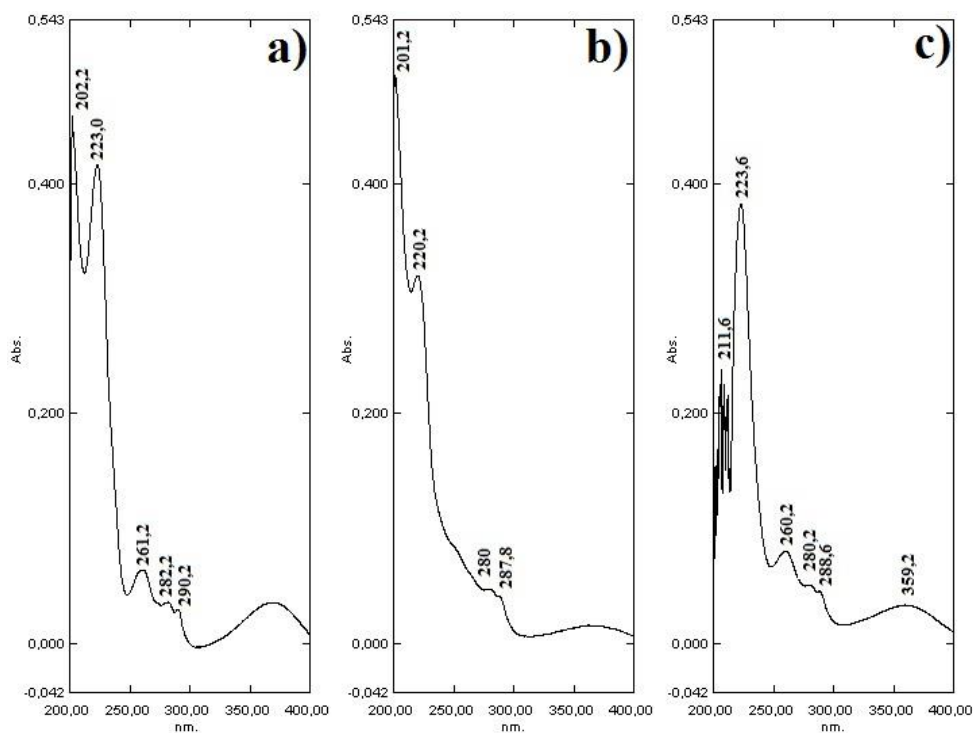


Figura 8- Espectros de absorção da solução de daptomicina SQR com concentração de 12 µg/mL, na região do ultravioleta, utilizando os seguintes solventes: a) metanol; b) HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M.



5.4.4.2. Análise da amostra de daptomicina e seletividade do método

A Figura 9 apresenta a sobreposição dos espectros obtidos com a daptomicina SQR e amostra de pó liofilizado, utilizando a água como solvente. A Figura 10 mostra a sobreposição dos espectros obtidos com a daptomicina SQR e placebo (hidróxido de sódio), utilizando também a água como solvente.

Figura 9- Sobreposição dos espectros de absorção da daptomicina SQR e amostra de pó liofilizado para solução injetável, na concentração de 12 µg/mL, utilizando água como solvente.

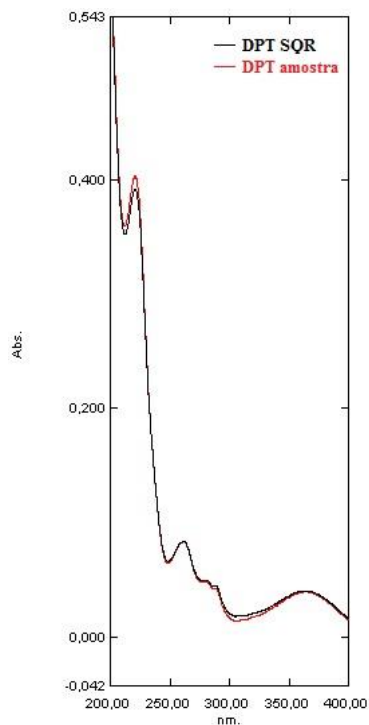
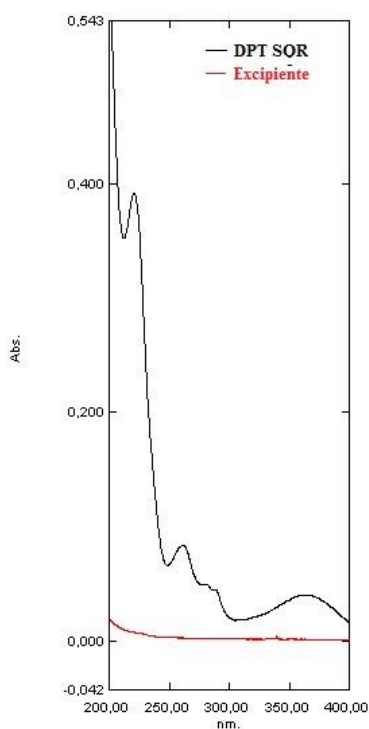


Figura 10- Sobreposição dos espectros de absorção da daptomicina SQR (12 µg/mL) e solução de placebo (NaOH), utilizando água como solvente.



5.4.5. Discussão

As técnicas espectrofotométricas, as quais incluem a espectrofotometria na região do ultravioleta, são baseadas na absorção da energia eletromagnética por moléculas, o que depende tanto da sua concentração, quanto da sua estrutura química (FB, 2010). Desta forma, o espectro de absorção de uma substância presente em solução é característico, dependendo da sua estrutura química. Assim, é possível identificar uma substância através da comparação do seu espectro em uma determinada faixa de comprimento de onda e o espectro da substância química de referência (FB, 2010; JP, 2011).

Para a caracterização de um fármaco utilizando a espectrofotometria no UV, a substância deve ser dissolvida em um solvente apropriado. Obviamente, a escolha deste solvente é muito importante. O principal critério a ser considerado é que ele não deve absorver radiação ultravioleta na mesma região que a substância cujo espectro está sendo determinado (PAVIA et al., 2010). No caso dos solventes testados, nenhum deles apresenta absorção na faixa espectral analisada.

A daptomicina SQR mostrou-se solúvel em todos os solventes testados, sendo eles a água, o metanol, o NaOH 0,1 M e o HCl 0,1 M. Quando usou-se a água purificada como solvente, o comprimento de onda de máxima absorção foi de 221 nm (Figura 7). Com o uso do HCl 0,1 M, este comprimento de onda apresentou-se ligeiramente inferior ao obtido com a água, em 220,2 nm (Figura 8b). Já com os outros dois solventes, NaOH 0,1 M e metanol (Figura 8c e Figura 8a), os comprimentos de onda relativos aos máximos de absorção foram de 223,6 e 223,0 nm, superiores aos obtidos com a água e o HCl 0,1 M. Quando foram utilizados os solventes NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M, o fármaco apresentou espectros de absorção sugestivos de degradação, pois observou-se uma menor absorvância em ambos os casos, no comprimento de onda de máxima absorção da molécula.

Analisando-se todos os solventes testados e tendo em vista que os espectros em água e metanol foram semelhantes, optou-se pelo uso da água tanto para as análises qualitativas quanto para o desenvolvimento do método quantitativo, já que é um solvente de baixo custo e não oferece riscos ao operador e ao meio ambiente. O fato de um método analítico não utilizar solventes orgânicos para suas análises é altamente relevante nos dias de hoje, quando as indústrias buscam cada vez mais reduzir os impactos de suas atividades sobre o meio ambiente.

Assim, após a escolha da água como o solvente mais apropriado para as análises, soluções aquosas de 12 µg/mL de daptomicina SQR e amostra de pó liofilizado para solução injetável foram analisadas e seus espectros de absorção foram comparados entre si. Os espectros gerados foram muito parecidos, mantendo o máximo de absorção no comprimento de onda em 221 nm, com uma pequena diferença de absorvância de 0,390 para daptomicina SQR e 0,403 para daptomicina em pó liofilizado para solução injetável (Figura 9).

Também foi realizada análise de solução aquosa do placebo, constituído apenas por NaOH, para verificar a ausência de interferência desta substância na análise da daptomicina pelo método desenvolvido (Figura 10). Assim, foi possível observar que o NaOH não apresenta nenhuma banda de absorção que pudesse interferir na análise do fármaco. Este fato demonstra a seletividade do método, parâmetro essencial para a validação de um método de identificação, conforme descrito pelos guias do ICH e pela RDC nº 899 de 2003 (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Com tudo isso, o método de espectrofotometria na região do ultravioleta desenvolvido pode ser usado para auxiliar a identificação da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável em análises de rotina do Controle de Qualidade deste fármaco.

5.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.5.1. Considerações gerais

A CLAE é um dos mais importantes membros de uma família de técnicas de separação. Para realizar esta técnica, são necessárias pequenas colunas preenchidas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões, com auxílio de equipamentos muito sofisticados, que podem ser completamente automatizados. Este método se destaca por apresentar algumas propriedades especiais, tais como a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em uma amostra em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997). Além disso, permite análises repetitivas e reprodutivas com a mesma coluna e possibilita o uso de uma ampla variedade de fases móveis e estacionárias, o que contribui para sua posição de destaque entre os métodos instrumentais de análise (JEFFERY et al., 1992).

A técnica de CLAE é mais usada para a análise quantitativa, no entanto pode ser muito útil no auxílio à identificação de fármacos, através da comparação dos tempos de retenção da

amostra e da respectiva SQR. Quando as substâncias analisadas são idênticas, obrigatoriamente apresentarão o mesmo tempo de retenção quando analisadas sob as mesmas condições.

Existem vários solventes orgânicos que podem ser utilizados na composição das fases móveis cromatográficas, no entanto, o metanol e a acetonitrila são aqueles mais citados em trabalhos publicados na literatura. O etanol, que é considerado um solvente ambientalmente favorável por causar menor impacto sobre o meio ambiente e ainda oferecer menos riscos à saúde dos operadores, não é muito mencionado (RIBEIRO et al., 2004). Considerando que as indústrias hoje em dia buscam minimizar os impactos de suas atividades sobre o meio ambiente, o objetivo desta etapa do trabalho foi desenvolver um método de CLAE qualitativo para a análise da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável, utilizando o etanol como a fase orgânica da fase móvel, devido às inúmeras vantagens que ele oferece. Além disso, esta etapa do trabalho serviu como base para o desenvolvimento e validação de método quantitativo por CLAE, que será descrito posteriormente.

5.5.2. Material

Para a análise cromatográfica foram utilizadas daptomicina SQR e daptomicina em pó liofilizado para solução injetável descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente.

Todas as soluções e fases móveis utilizadas durante este trabalho foram preparadas a partir de água ultrapurificada obtida através de equipamento Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, EUA). O etanol utilizado na preparação da fase móvel possuía grau HPLC e foi adquirido da J.T. Baker (México). A solução de ácido acético utilizada para ajustar o pH das fases móveis foi adquirida da J.T. Baker (México). As fases móveis, após preparadas, foram submetidas à degaseificação em banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique, SP, Brasil), por 30 minutos. Todas as soluções foram filtradas através de membrana de 0,45 µm (Pall Corporation, Michigan, EUA) antes de serem injetadas.

O equipamento de CLAE usado foi Waters, modelo 1525 (Waters Chromatography Systems, CA, EUA), conectado a detector de UV/Visível Waters 2487 e injetor manual 7725i com *loop* de 20 µL (Rheodyne Breeze, CA, EUA). A separação cromatográfica foi realizada através de condições isocráticas de fase reversa em coluna Agilent Zorbax C₁₈, 5 µm, 4,6 x 150 mm (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). As áreas dos picos foram integradas usando o *software* Empower[®].

Também foi usado cromatógrafo Shimadzu® (Kyoto, Japão) auto injetor modelo SIL-10A, acoplado a detector por arranjo de diodos (DAD) Shimadzu® modelo SPD-M10A, para a análise da pureza do pico da daptomicina durante a análise da amostra de pó liofilizado. O *software* utilizado neste caso foi o LC Solution®. Estas análises foram realizadas no Laboratório NUBB 2, localizado no Instituto de Química da UNESP, em Araraquara.

Os seguintes materiais também foram utilizados: balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo, Barueri, Brasil), micropipetador modelo 20-200 µL (Digipet, PR, Brasil) e peagômetro.

5.5.3. Método

5.5.3.1. Preparo da solução de daptomicina SQR

As soluções de daptomicina SQR foram preparadas na concentração de 40 µg/mL. Para isso, foi pesado o equivalente a 5,0 mg de daptomicina SQR (descrita no item 4.2) e transferido para balão volumétrico de 50 mL. O volume do balão foi completado com fase móvel e em seguida a solução foi adequadamente homogeneizada, resultando em solução estoque com concentração de 100 µg/mL. Depois disso, alíquota de 2 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 5 mL e o volume foi completado com fase móvel, resultando em solução de trabalho na concentração de 40 µg/mL. Esta solução foi submetida à filtração através de membrana de 0,45 µm antes das injeções.

5.5.3.2. Preparo da solução de daptomicina amostra

As soluções de daptomicina amostra de pó liofilizado também foram preparadas na concentração de 40 µg/mL. Para isso, primeiramente foi verificado o peso médio de três frascos-ampola de daptomicina (descritos no item 4.3) e preparado um *pool* de amostras, conforme descrito no item 5.3.2.1.3.1. A partir deste *pool*, o equivalente a 5,0 mg de daptomicina foi analiticamente pesado e transferido para balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completado com fase móvel e em seguida a solução foi adequadamente homogeneizada, resultando em uma solução estoque de 100 µg/mL. Depois disso, alíquota de 2 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 5 mL e o volume foi completado com fase móvel, resultando em solução de trabalho na concentração teórica de 40 µg/mL. Esta solução foi submetida à filtração através de membrana de 0,45 µm antes das injeções.

5.5.3.3. Preparo das fases móveis

Misturas de água e etanol foram preparadas em diferentes proporções antes de serem colocadas no equipamento. Cada fase móvel foi filtrada e levada ao ultrassom por 30 minutos para degaseificação antes do uso.

5.5.3.4. Ensaios preliminares

Ensaios preliminares foram realizados com o objetivo de encontrar condições favoráveis para a caracterização e posterior quantificação da daptomicina em pó para solução injetável, bem como reduzir a assimetria do pico, os danos para o sistema cromatográfico e para o meio ambiente. A Tabela 6 apresenta os parâmetros testados durante os testes preliminares.

Tabela 6- Parâmetros cromatográficos testados durante ensaios preliminares para desenvolvimento de método por CLAE, para quantificação de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável

Parâmetro	Descrição
Coluna cromatográfica	Agilent Zorbax C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm) (Santa Clara, CA, EUA)
Fases móveis	água : etanol (70 : 30, v/v)
	água : etanol (45 : 55, v/v)
	água : etanol (70 : 30, v/v) pH 3,5 (ajustado com ácido acético glacial)
	água : etanol (40 : 60, v/v) pH 4,5 (ajustado com ácido acético glacial)
	água : etanol (45 : 55, v/v) pH 4,5 (ajustado com ácido acético glacial)
Vazões (mL/min)	água : etanol (50 : 50, v/v) pH 4,5 (ajustado com ácido acético glacial)
	0,5
	0,6
	0,8
	1,0
	1,5

A partir dos resultados obtidos, foi possível estabelecer os parâmetros ideais para a realização do método. Estas condições estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7- Parâmetros estabelecidos para a determinação de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável pelo método de CLAE

Parâmetros	Descrição
Fase móvel	água : etanol (45 : 55, v/v) pH 4,5 (ajustado com ácido acético glacial)
Coluna analítica	Agilent Zorbax C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm)
Detecção	221 nm
Vazão	0,6 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25 °C ± 2 °C
Tempo de retenção	± 5,7 minutos

5.5.3.5. Teste de conformidade dos sistemas cromatográficos

O teste de conformidade de sistemas cromatográficos é uma etapa essencial durante o desenvolvimento de um método, já que tem como objetivo assegurar que os parâmetros cromatográficos selecionados para a análise estão aptos a fornecer resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis (PASCHOAL et al., 2008).

Com este propósito, cada condição cromatográfica testada foi avaliada quanto à conformidade do sistema, através do cálculo dos seguintes parâmetros: tempo de retenção (t_R), número de pratos (N) e os fatores de cauda (FC), de assimetria (A_S) e de retenção (k).

Além disso, após a seleção do sistema cromatográfico com melhor desempenho no teste de conformidade, foi realizada uma análise mais aprofundada da conformidade deste sistema, analisando-se 6 cromatogramas de daptomicina SQR obtidos sob estas condições.

Os valores de t_R foram fornecidos pelo *software* do equipamento de CLAE utilizado.

O número de pratos foi calculado segundo a Equação 2.

$$N = 5,54 \times (t_R/W_{50})^2 \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

t_R = tempo de retenção (em minutos)

W_{50} = largura do pico a meia altura

Os fatores de cauda (FC) e de assimetria (A_s) foram calculados segundo as Equações 3 e 4, respectivamente, sendo A_s calculado a 10% da altura do pico, e FC calculado a 5% desta altura. A Figura 11 mostra as medidas relacionadas ao cálculo destes parâmetros.

$$FC = (a + b)/2a$$

Equação 3

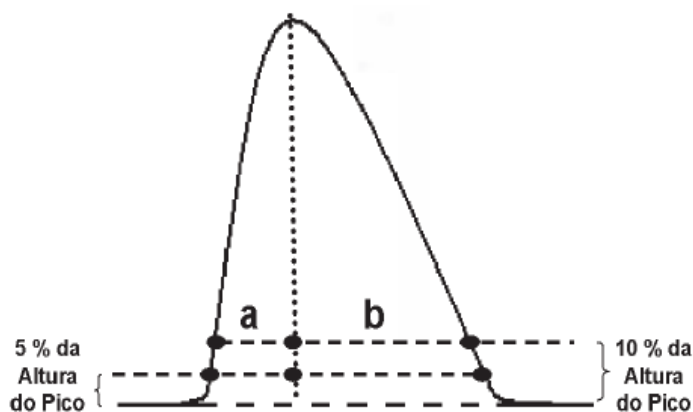
$$A_s = b/a$$

Equação 4

Em que:

a e b = distâncias entre o sinal máximo do pico até as linhas verticais e perpendiculares à linha de base que interceptam o traço a 5% (para o cálculo do FC) ou 10% (para o cálculo de A_s) de sua altura (Figura 11).

Figura 11- Medidas relacionadas à determinação dos fatores de cauda (FC) e assimetria do pico cromatográfico (A_s), calculados pelas Equações 3 e 4.



Fonte: PASCHOAL et al., 2008.

O fator de retenção (k), por sua vez, foi calculado através da Equação 5.

$$k = \left(\frac{t_R - t_0}{t_0} \right)$$

Equação 5

Em que:

t_R = tempo de retenção

t_0 = tempo de retenção do composto não-retido

As equações foram baseadas em COLLINS; BRAGA; BONATO (2006) e PASCHOAL et al. (2008).

5.5.3.6. Análise da amostra de daptomicina e seletividade do método

Após a seleção da fase móvel mais adequada, foi realizada a análise da seletividade do método, para verificar se há interferência do excipiente nas análises e assim validar o método qualitativo conforme os guias do ICH e RDC 899 de 2003 (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Para isso, foi preparada uma solução de placebo, constituído apenas por hidróxido de sódio, na mesma concentração que ele estaria em uma solução de 40 µg/mL de amostra de daptomicina em pó liofilizado. Para isso, foi pesada uma massa de 10 mg de hidróxido de sódio e transferida para balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão foi completado com água ultrapurificada e em seguida a solução foi adequadamente homogeneizada, resultando em solução com concentração de 100 µg/mL. A partir desta solução, foi transferida uma alíquota de 0,172 mL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água ultrapurificada, obtendo-se uma solução de 1,72 µg/mL, mesma concentração de hidróxido de sódio que teria uma solução de 40 µg/mL de amostra de pó liofilizado de daptomicina. Esta solução foi submetida à filtração através de membrana de 0,45 µm antes de ser injetada no equipamento. Após a sua análise, seu cromatograma foi comparado ao obtido com a solução da daptomicina SQR, para verificar que há alguma interferência do excipiente na análise da daptomicina.

Além disso, foi realizada a análise de uma solução de amostra de daptomicina em pó liofilizado para avaliar a pureza do pico da daptomicina e certificar que não há nenhuma interferência da matriz. Para isso, uma solução de amostra de daptomicina foi preparada de acordo com o descrito no item 5.5.3.2 e analisada em cromatógrafo Shimadzu® (Kyoto, Japão) Auto Injector modelo SIL-10A, acoplado a detector por arranjo de diodos (DAD) Shimadzu® modelo SPD-M10A.

A seletividade do método quanto aos produtos de degradação foi avaliada e será descrita em etapa posterior do trabalho, durante a validação de ensaio quantitativo por CLAE.

5.5.4. Resultados

5.5.4.1. Ensaios preliminares

Durante os ensaios preliminares, foram testadas as seguintes combinações de parâmetros descritos na Tabela 6.

- **Sistema 1:** Fase móvel: água : etanol (70 : 30, v/v) (sem ajuste de pH); vazão: 0,8 mL/min.
- **Sistema 2:** Fase móvel: água : etanol (70 : 30, v/v) pH 3,5 (ajustado com ácido acético glacial); vazão: 0,8 mL/min.
- **Sistema 3:** Fase móvel: água : etanol (70 : 30, v/v) pH 3,5 (ajustado com ácido acético glacial); vazão: 1,0 mL/min.
- **Sistema 4:** Fase móvel: água : etanol (70 : 30, v/v) pH 3,5 (ajustado com ácido acético glacial); vazão: 1,5 mL/min.
- **Sistema 5:** Fase móvel: água : etanol (50 : 50, v/v) pH 4,5 (ajustado com ácido acético glacial); vazão: 0,8 mL/min.
- **Sistema 6:** Fase móvel: água : etanol (50 : 50, v/v) pH 4,5 (ajustado com ácido acético glacial); vazão: 1,0 mL/min.
- **Sistema 7:** Fase móvel: água : etanol (45 : 55, v/v) (sem ajuste de pH); vazão: 0,6 mL/min.
- **Sistema 8:** Fase móvel: água : etanol (45 : 55, v/v) (sem ajuste de pH); vazão: 0,8 mL/min.
- **Sistema 9:** Fase móvel: água : etanol (45 : 55, v/v) pH 4,5 (ajustado com ácido acético glacial); vazão: 0,8 mL/min.
- **Sistema 10:** Fase móvel: água : etanol (45 : 55, v/v) pH 4,5 (ajustado com ácido acético glacial); vazão: 0,6 mL/min.
- **Sistema 11:** Fase móvel: água : etanol (40 : 60, v/v) pH 4,5 (ajustado com ácido acético glacial); vazão: 0,5 mL/min.
- **Sistema 12:** Fase móvel: água : etanol (40 : 60, v/v) pH 4,5 (ajustado com ácido acético glacial); vazão: 0,6 mL/min.
- **Sistema 13:** Fase móvel: água : etanol (40 : 60, v/v) pH 4,5 (ajustado com ácido acético glacial); vazão: 0,8 mL/min.
- **Sistema 14:** Fase móvel: água : etanol (40 : 60, v/v) pH 4,5 (ajustado com ácido acético glacial); vazão: 1,0 mL/min.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos através da análise dos sistemas cromatográficos realizada para todos os sistemas testados.

Tabela 8- Análise de conformidade do sistema obtida para os sistemas cromatográficos testados durante os testes preliminares para desenvolvimento de método qualitativo de CLAE

Sistema	t _R (min)	Conformidade dos sistemas cromatográficos			
		N (> 2000) ¹	FC (< 2,0) ¹	A _s (< 2,0) ¹	k (> 2,0) ¹
1	*	*	*	*	*
2	*	*	*	*	*
3	*	*	*	*	*
4	*	*	*	*	*
5	7,768	1768,41	1,32	1,05	3,09
6	6,185	1751,72	1,25	1,06	2,26
7	**	**	**	**	**
8	4,291	1895,91	2,75	2,42	1,26
9	4,480	1891,97	1,12	1,07	1,36
10	5,858	2246,44	1,20	1,14	2,08
11	4,739	2135,42	1,10	1,00	1,49
12	3,972	2974,14	1,13	1,00	1,09
13	2,905	1288,61	1,17	1,20	0,53
14	2,360	2100,11	1,05	0,95	0,24

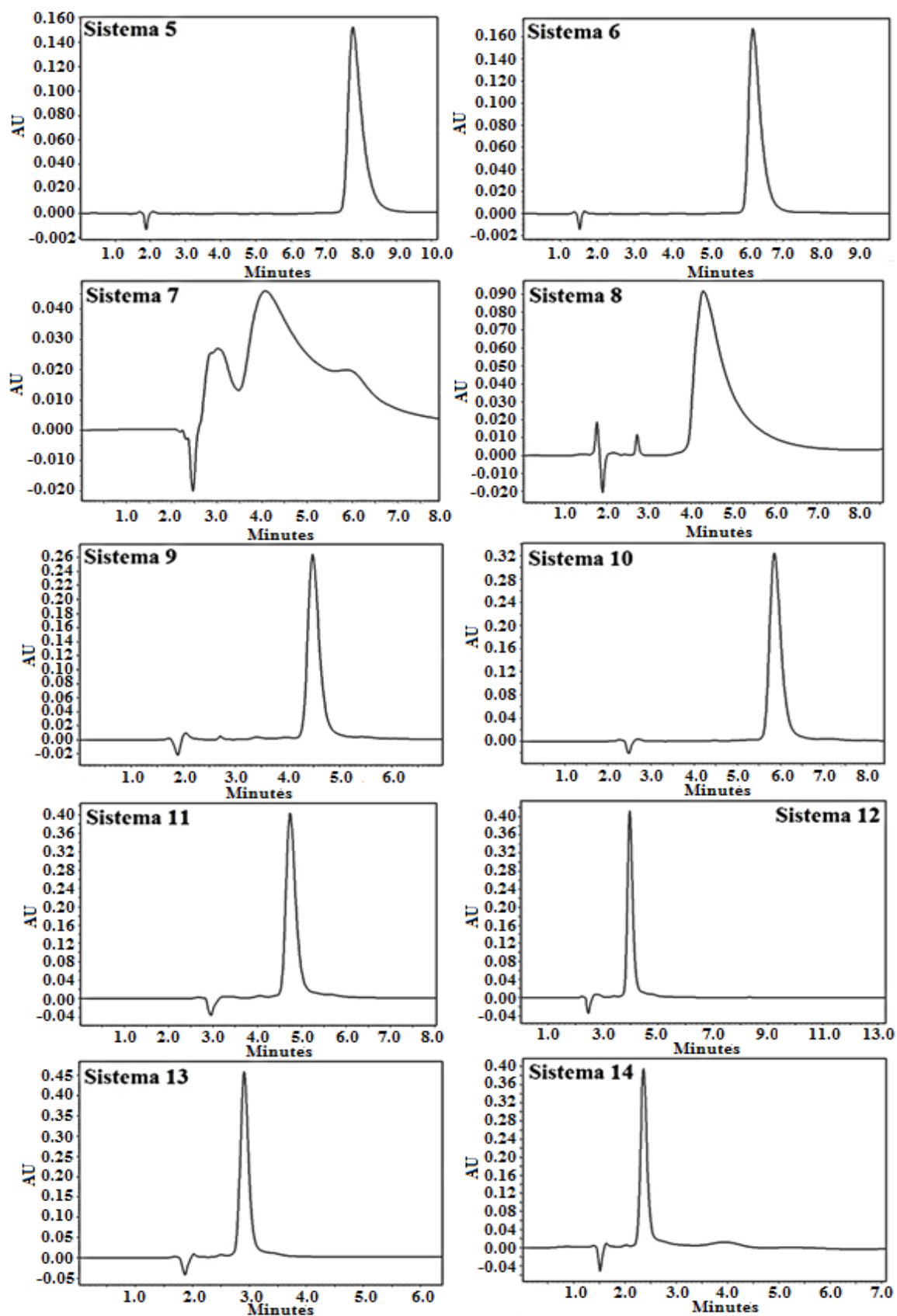
¹ Valor de referência (FDA, 1994)

* Não foi possível calcular a conformidade dos sistemas cromatográficos de 1 a 4, porque não houve formação de picos (até 20 minutos de corrida).

** Não foi possível calcular os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico 7, porque não houve a formação de um pico bem delimitado, mas sim um pico disforme, o qual inviabilizou o cálculo.

A Figura 12 mostra os cromatogramas referentes aos Sistemas 5 a 14. Os Sistemas 1 a 4 não apresentaram picos nos cromatogramas, portanto não estão representados com figuras.

Figura 12- Cromatogramas referentes aos Sistemas 5 a 14, obtidos durante os ensaios preliminares para a análise da daptomicina por CLAE.



A Figura 13 apresenta o cromatograma obtido com o Sistema 10, considerado o melhor sistema testado, e a Tabela 9 apresenta os resultados de uma análise mais aprofundada de sua adequabilidade.

Figura 13- Cromatograma de daptomicina SQR (40 µg/mL) obtido pelo Sistema 10 durante os ensaios preliminares para a análise da daptomicina por CLAE. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm).

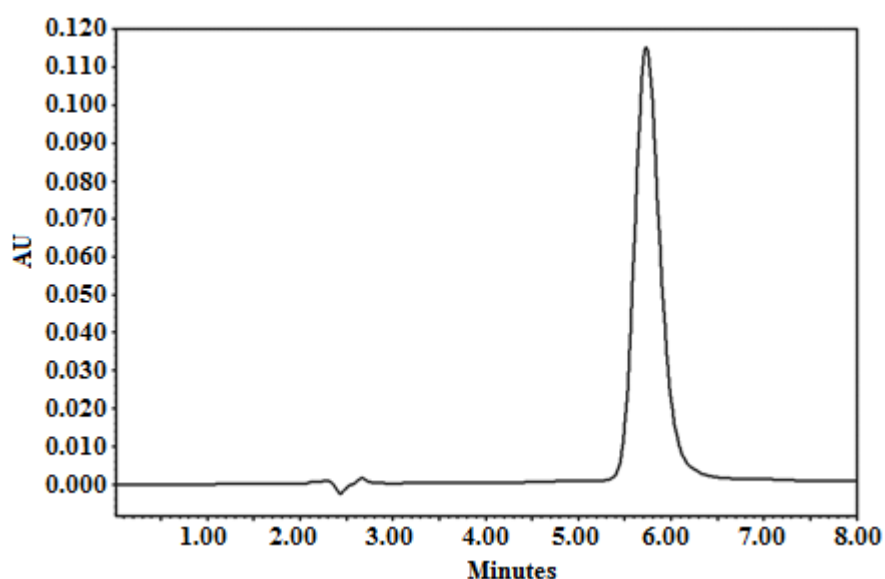


Tabela 9- Análise de conformidade do Sistema 10 - fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial; fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm)

Conformidade do sistema cromatográfico						
	tr (min)	N (> 2000) ¹	FC (< 2,0) ¹	A _s (< 2,0) ¹	k (> 2,0) ¹	Área do pico (AU)
	5,858	2328,87	1,12	1,07	2,08	1983908
	5,743	2238,33	1,12	1,07	2,02	1910405
	5,743	2238,33	1,12	1,07	2,02	1927488
	5,720	2220,43	1,12	1,07	2,01	1955889
	5,715	2216,67	1,08	1,07	2,01	1929113
	5,715	2216,55	1,12	1,07	2,01	1952269
Média	5,749	2243,20	1,11	1,07	2,026	1943179
DPR²%	0,96	1,92	1,47	0,00	1,43	1,35

¹ Valor de referência (FDA, 1994)

² DPR: desvio padrão relativo

5.5.4.2. Análise da amostra de daptomicina e seletividade do método

A Figura 14 apresenta a sobreposição dos cromatogramas obtidos com a daptomicina SQR e amostra de pó liofilizado sob as condições cromatográficas descritas no Sistema 10 [fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial; coluna analítica: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm); vazão: 0,6 mL/min], considerado o melhor sistema entre os testados. A Figura 15 mostra a sobreposição dos espectros obtidos com a daptomicina SQR e placebo (hidróxido de sódio), também sob as mesmas condições.

Figura 14- Sobreposição de cromatogramas de daptomicina SQR e em pó para solução injetável (40 µg/mL) obtidos pelo método de CLAE desenvolvido. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial; coluna analítica: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm); vazão: 0,6 mL/min.

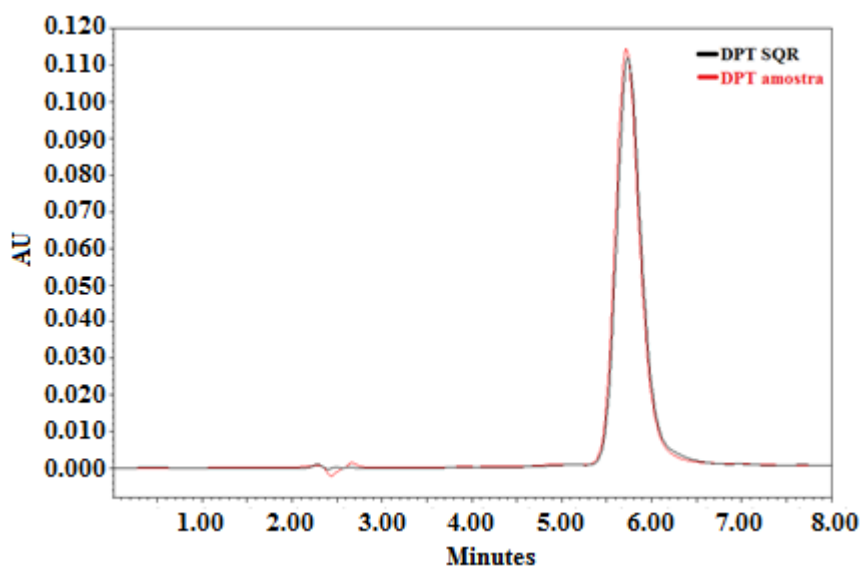
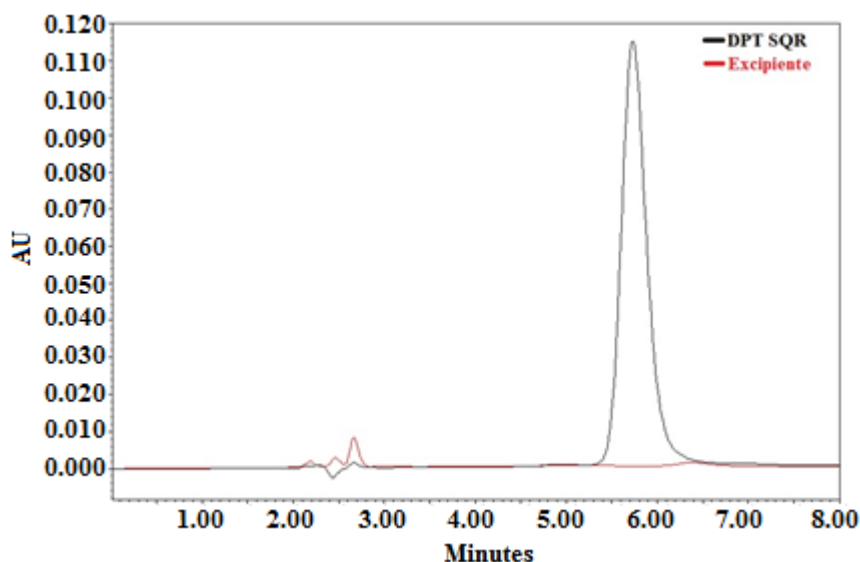


Figura 15- Sobreposição de cromatogramas de daptomicina SQR e solução de placebo para a análise da seletividade do método de CLAE desenvolvido. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial; coluna analítica: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm); vazão: 0,6 mL/min. DPT: daptomicina.



Também foi preparada uma solução de amostra de daptomicina em pó liofilizado e esta foi analisada em equipamento de CLAE acoplado a detector por arranjo de diodos para verificar a pureza do pico da daptomicina. A pureza encontrada foi de 100%.

5.5.5. Discussão

A escolha da composição das fases móveis que foram testadas nos testes preliminares levou em consideração dois fatores: o primeiro deles é o uso do etanol como a fase orgânica da fase móvel, visto que é um solvente ambientalmente favorável, apresenta fácil descarte e ainda oferece menos riscos para a saúde dos operadores que outros solventes mais comumente usados para esta finalidade (RIBEIRO et al., 2004); e o segundo é a não utilização de soluções tampão na sua composição, considerando que os sais que compõem estas soluções tendem a se precipitar e depositar nas colunas e em todo o sistema cromatográfico, reduzindo sua vida útil. Além disso, o uso de tampões demanda longas lavagens do sistema cromatográfico após o seu uso, o que gera maior consumo de energia e solventes.

Na literatura, trabalhos que mencionam o uso do etanol como constituinte da fase móvel não são tão comuns quanto aqueles em que se faz o uso de outros solventes, tais como o metanol e a acetonitrila. Esta tendência vem do fato de que misturas de água com o etanol geram soluções mais viscosas que as formadas com os outros solventes citados, e isto causa

um aumento das pressões de trabalho. Este fato era considerado um problema muitos anos atrás, quando os equipamentos de CLAE não suportavam pressões mais elevadas, o que não ocorre com equipamentos mais modernos, os quais suportam pressões muito mais altas. Isto tornou viável o uso do etanol para métodos de CLAE (RIBEIRO et al., 2004). Portanto, a cultura de não se usar o etanol em CLAE por este motivo, hoje em dia, não se aplica mais. Além disso, estudos mostram que misturas de etanol e água apresentam boas propriedades cromatográficas quando usadas com colunas de fase reversa C_8 e C_{18} (MIYABE; TAKEUCHI; TEZUCA, 1999; RIBEIRO et al., 1999; RIBEIRO et al., 2004).

Outro motivo pelo qual o etanol é um solvente pouco utilizado em métodos cromatográficos é o fato de que em alguns países, como por exemplo, os Estados Unidos, onde muitos métodos são desenvolvidos, há um rígido controle sobre a comercialização deste solvente (RIBEIRO et al., 2004).

Quanto ao risco para os operadores, os seres humanos são sensíveis à intoxicação por metanol, a qual ocorre mais frequentemente após a sua ingestão, mas que também pode dar-se após a inalação de altas concentrações de vapor e pela absorção percutânea. Além disso, o metanol é metabolizado e excretado mais lentamente que o etanol (WHO, 1997). Quanto à acetonitrila, a exposição do operador a este solvente orgânico pode causar efeitos adversos à saúde. Um dos produtos do seu metabolismo é o cianeto, o qual é a causa da maior parte da toxicidade desta substância. Além disso, a acetonitrila é rapidamente absorvida pelos pulmões e pela pele, favorecendo a intoxicação ocupacional (WHO, 1993).

Para o desenvolvimento satisfatório de um método analítico cromatográfico, é necessário assegurar que todos os parâmetros escolhidos estejam aptos a fornecer resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis. Para isso, como etapa inicial do desenvolvimento analítico, deve-se realizar testes experimentais de conformidade do sistema cromatográfico, os quais incluem a avaliação de alguns parâmetros, tais como o fator de retenção, o fator de cauda, o número de pratos e fator de assimetria (PASCHOAL et al., 2008). Esta etapa é considerada como obrigatória pelo ICH (2005) para o processo de validação de métodos cromatográficos. Por tais motivos, a primeira etapa do processo de desenvolvimento do método qualitativo por CLAE foi a análise da conformidade do sistema. Todas as combinações de parâmetros testadas foram submetidas à análise para verificar qual delas apresentou o melhor desempenho.

Entre todos os sistemas testados, o de número 10 foi o que apresentou em conjunto os melhores resultados de conformidade do sistema, como pode ser observado na Tabela 8. É

recomendado que os valores calculados para os fatores de cauda e de assimetria sejam inferiores a 2,0; o número de pratos deve ser maior do que 2000 e o fator de retenção deve ser superior a 2,0 (FDA, 1994). O Sistema 10, baseado em fase móvel composta por água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial, coluna analítica Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm), vazão: 0,6 mL/min e detecção no UV em 221 nm, foi o único dos sistemas testados a apresentar resultados satisfatórios em todos estes quesitos, por isso foi o escolhido para a realização do método.

Após a seleção do melhor sistema cromatográfico, foi realizada uma análise mais aprofundada de sua conformidade e os resultados estão expostos na Tabela 9. Para isso, foi realizada a análise de seis cromatogramas diferentes obtidos sob as condições cromatográficas do Sistema 10. Esta análise confirmou que os parâmetros cromatográficos escolhidos são capazes de fornecer resultados com precisão e exatidão confiáveis, visto que todos os parâmetros se mantiveram em conformidade com o que é estabelecido pelo FDA (1994).

O comprimento de onda de detecção no UV estabelecido para todas as análises foi de 221 nm. Este comprimento de onda foi o escolhido por representar o máximo de absorção da molécula de daptomicina quando analisada por varredura na faixa do UV (200-400 nm), como pode ser visto na Figura 7, durante o desenvolvimento do método de espectrofotometria na região do UV.

O tempo de análise estabelecido foi de 8 minutos (com tempo de retenção da daptomicina de $\pm 5,8$ minutos) e a vazão foi de 0,6 mL/min. Ambos os parâmetros são considerados relativamente baixos para um método de CLAE e representam outra vantagem do método proposto, já que por tais motivos o consumo de solventes orgânicos e de energia elétrica são menores, o que contribui com o meio ambiente e também economicamente com a indústria farmacêutica.

Quanto à pressão na coluna, alvo de preocupação quando se usa o etanol na composição da fase móvel, ela se apresentou consideravelmente abaixo do limite permitido pelo equipamento (em torno de 1300 psi, sendo que o limite é de 4000 psi). Este fato pode ser atribuído ao tamanho da coluna (150 mm) e também à baixa vazão. Desta forma, a pressão não se apresentou como um fator limitante para o método.

Após a escolha do sistema cromatográfico mais apropriado, foi realizada a análise de solução da daptomicina em pó liofilizado para solução injetável, de modo a conferir se o método é adequado para auxiliar na identificação do fármaco na forma farmacêutica. Desta forma, foram preparadas soluções de daptomicina SQR e amostra, nas mesmas concentrações,

e estas foram analisadas pelo método proposto. Depois disso, os cromatogramas obtidos foram comparados entre si e ambos se mostraram idênticos, como pode ser observado na Figura 14.

Também foi realizada análise de solução do placebo, constituído apenas por NaOH, para verificar a ausência de interferência desta substância na análise da daptomicina pelo método desenvolvido (Figura 15). Assim, foi possível observar que o NaOH não gerou nenhum pico ou interferência na análise do antimicrobiano. Este fato demonstra a seletividade do método, parâmetro essencial para a validação de um método de identificação, conforme descrito pelos guias do ICH e pela RDC nº 899 de 2003 (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Para confirmar a seletividade do método, a pureza do pico da daptomicina obtido com a solução de amostra de pó liofilizado foi analisada em equipamento de CLAE acoplado a detector de arranjo de diodos. Neste ensaio, foi possível verificar que o pico da daptomicina se encontra em uma porcentagem de 100% de pureza e isto mostra que não há nenhuma interferência dos componentes da sua matriz na análise. Este fato confirma a seletividade do método.

Em etapa posterior do trabalho, a capacidade indicativa de estabilidade deste método também será demonstrada, durante desenvolvimento e validação de método quantitativo para análise da daptomicina por meio de CLAE.

A CLAE pode ser muito útil no auxílio à identificação de fármacos, através da comparação dos tempos de retenção da amostra e da respectiva SQR, quando usada em conjunto com outros métodos, tais como espectrometria no infravermelho, espectrofotometria do UV, espectrometria de massas, entre outros (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

Por fim, o método de CLAE desenvolvido pode ser usado para auxiliar na identificação da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável em análises de rotina do Controle de Qualidade deste fármaco.

5.6. Eletroforese capilar (EC)

5.6.1. Considerações gerais

A eletroforese capilar é um método de separação que vem sendo cada vez mais utilizado na atualidade, tanto para análises qualitativas, quanto para análises quantitativas de compostos. Isto é resultado de sua simplicidade instrumental, de seu baixo custo analítico, da variedade dos modos de separação que podem ser efetuados em uma única coluna capilar e da

ampla variedade de compostos passíveis de análise em cada modo (TAVARES, 1997). Separa desde pequenas moléculas, orgânicas ou inorgânicas, até aquelas maiores e mais complexas (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

Na EC, a separação de compostos iônicos ou ionizados ocorre no interior de um capilar, sob a influência de um campo elétrico. Os solutos são dissolvidos em uma solução eletrolítica (ou eletrólito), a qual é uma eficaz condutora de eletricidade e peça fundamental para a separação eletroforética (PETERSEN; MOHAMMAD, 2001; FB, 2010; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). Esta solução, tamponante, normalmente é constituída em sua maior parte por água e utilizada em volumes muito baixos para cada análise. Desta forma, a EC é considerada ambientalmente favorável, pois gera poucos resíduos e toxicidade para operadores e meio ambiente (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

Considerando todas as vantagens que a EC oferece e por ser considerada uma técnica complementar à CLAE para a identificação de compostos, o objetivo deste estudo foi desenvolver um método de EC qualitativo para auxiliar na identificação da daptomicina em pó liofilizado para solução injetável. Além disso, esta etapa do trabalho serviu como base para o desenvolvimento e validação de método quantitativo por EC, que será descrito na seção “Análise Quantitativa”.

Este método foi desenvolvido no Laboratório de Técnicas de Separação e Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

5.6.2. Material

Para a análise eletroforética foram utilizadas daptomicina SQR e daptomicina em pó liofilizado para preparações injetáveis descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente.

Os eletrólitos de corrida utilizados neste trabalho foram preparados a partir de água ultrapurificada obtida através de equipamento Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, EUA). Fosfato de potássio dibásico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e fosfato de potássio monobásico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) também foram utilizados para o preparo dos eletrólitos de corrida. O eletrólito, depois de preparado, foi submetido à degaseificação em banho ultrassônico SoniClean 2PS (Sanders Medical, Santa Rita do Sapucaí, Brasil), por 10 minutos. Todas as soluções foram filtradas através de membrana de 0,45 µm (Pall Corporation, Michigan, EUA) antes de serem submetidas à análise.

O equipamento de eletroforese capilar usado foi o P/AC[®] MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA), com detector por arranjo de diodos (DAD). O *software LC Solution* foi utilizado para a análise dos eletroferogramas.

As análises foram realizadas em capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm.

O *software Microsoft Excel* (2013) foi utilizado para a construção da curva analítica.

Os seguintes equipamentos também foram utilizados: banho-maria modelo Q334M (Quimis, Diadema, Brasil); balança analítica modelo CPA225D (Sartorius, Göttingen, Alemanha); micropipetador modelo 20-200 µL (Digipet, Curitiba, Brasil).

5.6.3. Método

5.6.3.1. Preparo da solução de daptomicina SQR

As soluções de daptomicina SQR foram preparadas na concentração de 100 µg/mL. Para isso, primeiro foi pesado o equivalente a 10,0 mg de daptomicina SQR (descrita no item 4.2) e transferido para balão volumétrico de 20 mL. O volume do balão foi completado com água ultrapurificada e em seguida a solução foi adequadamente homogeneizada, resultando em solução estoque com concentração de 500 µg/mL. Depois disso, alíquota de 0,2 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 1 mL e o volume foi completado com água ultrapurificada, resultando em solução de trabalho na concentração de 100 µg/mL. Esta solução foi submetida à filtração através de membrana de 0,45 µm antes de ser submetida à análise.

5.6.3.2. Preparo da solução de daptomicina amostra

As soluções de daptomicina amostra de pó liofilizado também foram preparadas na concentração teórica de 100 µg/mL. Para isso, primeiramente foi verificado o peso médio de três frascos-ampola de daptomicina (descritos no item 4.3) e preparado um *pool* de amostras, conforme descrito no item 5.3.2.1.3.1. A partir deste *pool*, o equivalente a 10,0 mg de daptomicina foi analiticamente pesado e transferido para balão volumétrico de 20 mL. O volume do balão foi completado com água ultrapurificada e em seguida a solução foi adequadamente homogeneizada, resultando em uma solução estoque de 500 µg/mL. Depois disso, alíquota de 0,2 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 1 mL e o volume foi completado com água ultrapurificada, resultando em solução de trabalho na

concentração de 100 µg/mL. Esta solução foi submetida à filtração por membrana de 0,45 µm antes de ser submetida à análise.

5.6.3.3. Preparo dos eletrólitos

Soluções tampão fosfato de potássio foram preparadas em diferentes concentrações e valores de pH para a realização dos ensaios preliminares. Cada eletrólito foi filtrado em membrana de 0,45 µm e levado ao ultrassom por 10 minutos para degaseificação antes do uso.

5.6.3.4. Condicionamento do capilar

O condicionamento inicial do capilar foi realizado através de lavagens de 20 minutos com cada uma das soluções a seguir, exatamente nesta ordem: solução de NaOH 0,1 M, água ultrapurificada, solução de NaOH 0,1 M, água ultrapurificada e eletrólito de corrida. O condicionamento diário do capilar consistiu em lavagens com solução de NaOH 0,1 M, água ultrapurificada e eletrólito por 10 minutos, cada um. Para as demais corridas, o capilar foi submetido ao pré-condicionamento por meio de lavagem com NaOH 0,1 M, água e eletrólito, por 30 segundos, 30 segundos e 1 minuto, respectivamente.

5.6.3.5. Ensaios preliminares

Ensaios preliminares foram realizados para encontrar as melhores condições para a caracterização e posterior quantificação da daptomicina em pó liofilizado para solução injetável. A Tabela 10 apresenta os parâmetros testados durante os testes preliminares.

Tabela 10- Parâmetros eletroforéticos testados durante ensaios preliminares para desenvolvimento de método por EC, para identificação e quantificação de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável

Parâmetro	Descrição
Capilar	Capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm
Eletrólito	Tampão fosfato de potássio pH 7,0 50 mM Tampão fosfato de potássio pH 7,0 25 mM Tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM
Tensão (kV)	10 15 18 20

A partir dos resultados obtidos, foi possível estabelecer os parâmetros ideais para a realização do método. Estas condições estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11- Parâmetros estabelecidos para a determinação de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável pelo método de EC

Parâmetros	Descrição
Capilar	Capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm
Eletrólito	Tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM
Deteção	200 nm
Tensão (kV)	15
Temperatura do cartucho ($^{\circ}\text{C}$)	25

5.6.3.6. Teste de conformidade do sistema eletroforético

Assim como para métodos cromatográficos, a análise de conformidade de sistemas eletroforéticos também é essencial para garantir que os parâmetros selecionados para a análise estão aptos a fornecer resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis.

Desta forma, o sistema eletroforético escolhido foi avaliado quanto ao tempo de migração (t_m), o número de pratos (N) e os fatores de cauda (FC) e de assimetria (A_s). Estes parâmetros foram calculados pelo *software* do equipamento de eletroforese capilar utilizado.

Para isso, foram realizadas seis injeções da mesma solução de daptomicina SQR na concentração de 100 µg/mL, avaliando-se o DPR entre as respostas de cada um dos parâmetros analisados.

5.6.3.7. Análise da amostra de daptomicina e seletividade do método

A seletividade do método foi realizada para verificar se há interferência do excipiente nas análises e assim validar o método qualitativo conforme os guias do ICH e RDC 899 de 2003 (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Para isso, foi preparada uma solução de placebo, constituído apenas por hidróxido de sódio, na mesma concentração que estaria em uma solução de 100 µg/mL de amostra de daptomicina em pó liofilizado. Considerando que o excipiente está presente em 7,93% na amostra de pó liofilizado, como verificado na execução do peso médio (seção 5.3.2.1.3.1), a concentração de hidróxido de sódio em uma solução de 100 µg/mL de amostra de daptomicina é 8,6 µg/mL.

Para preparar a solução de placebo, foi pesada uma massa de 4,3 mg de NaOH e transferida para balão volumétrico de 500 mL, cujo volume foi completado com água purificada. Em seguida, a solução foi adequadamente homogeneizada, resultando em solução com concentração de 8,6 µg/mL de NaOH. Esta solução foi submetida à filtração em membrana de 0,45 µm antes de ser injetada no equipamento. Após a sua análise, seu eletroforograma foi comparado ao obtido com a solução da daptomicina SQR, para verificar se há alguma interferência do excipiente na análise da daptomicina.

Além disso, foi realizada a análise de uma solução de amostra de daptomicina em pó liofilizado para avaliar a pureza do pico da daptomicina e certificar que não há nenhuma interferência da matriz. Para isso, uma solução de amostra de daptomicina na concentração de 100 µg/mL foi preparada de acordo com o descrito no item 5.4.3.2 e injetada no equipamento nas condições eletroforéticas selecionadas para o método. A pureza do pico foi calculada pelo *software* do equipamento de eletroforese capilar.

A seletividade do método quanto aos produtos de degradação também foi avaliada e será descrita em etapa posterior do trabalho, durante a validação de ensaio quantitativo por eletroforese capilar.

5.6.4. Resultados

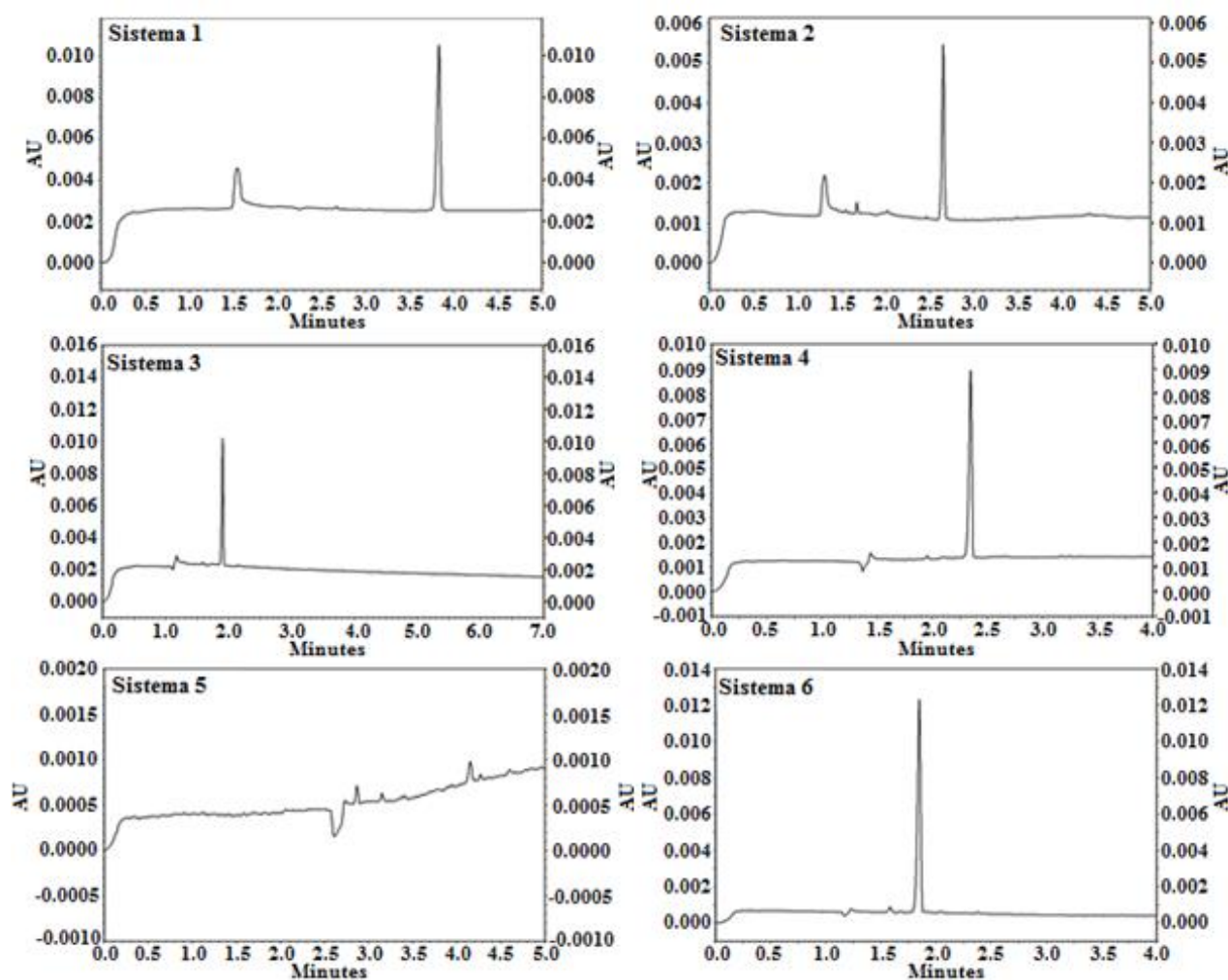
5.6.4.1. Ensaios preliminares e teste de conformidade do sistema eletroforético

Durante os ensaios preliminares, foram testadas as seguintes combinações de parâmetros descritos na Tabela 10.

- **Sistema 1:** Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 50 mM; tensão: 20 kV.
- **Sistema 2:** Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 25 mM; tensão: 20 kV.
- **Sistema 3:** Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 25 mM; tensão: 18 kV.
- **Sistema 4:** Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 25 mM; tensão: 15 kV.
- **Sistema 5:** Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 25 mM; tensão: 10 kV.
- **Sistema 6:** Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM; tensão: 15 kV.

A Figura 16 mostra os eletroferogramas obtidos para cada sistema testado.

Figura 16- Eletroferogramas referentes aos Sistemas 1 a 6, obtidos durante os ensaios preliminares para a análise da daptomicina por eletroforese capilar.



A Figura 17 apresenta o eletroferograma obtido com o Sistema 6, considerado o melhor sistema testado, e a Tabela 12 apresenta os resultados da análise de sua adequabilidade.

Figura 17- Eletroferograma de daptomicina SQR (100 µg/mL) obtido pelo Sistema 6 durante os ensaios preliminares para a análise da daptomicina por eletroforese capilar. Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM; tensão: 15 kV; capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm.

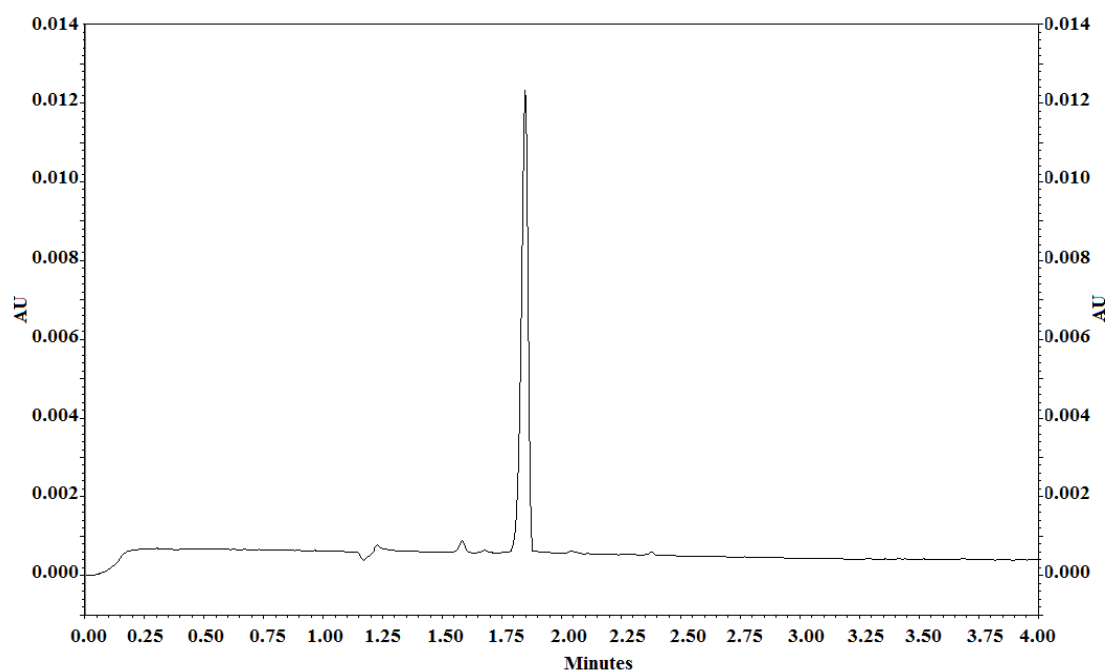


Tabela 12- Parâmetros obtidos na análise de conformidade do Sistema 6 - eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM; tensão: 15 kV; capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm

Conformidade do sistema eletroforético					
	t _m (min)	N (> 2000) ¹	FC (< 2,0) ¹	A _s (< 2,0) ¹	Altura do pico (AU)
	1,71	24222	0,90	0,92	11690
	1,75	24256	0,88	0,93	11543
	1,74	24237	0,90	0,93	11361
	1,74	24544	0,91	0,93	11864
	1,72	24843	0,91	0,92	11920
	1,72	24476	0,90	0,91	11436
Média	1,73	24429,7	0,90	0,92	11635,7
DPR ² %	0,90	1,00	1,22	0,88	1,96

¹ Valor de referência (FDA, 1994)

² DPR: desvio padrão relativo

5.6.4.2. Análise da amostra de daptomicina e seletividade do método

A Figura 18 apresenta a sobreposição dos eletroferogramas obtidos com a daptomicina SQR e amostra de pó liofilizado sob as condições eletroforéticas descritas no Sistema 6 (eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM; tensão: 15 kV; capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm), considerado o melhor sistema entre os testados. A Figura 19 mostra a sobreposição dos eletroferogramas obtidos com a daptomicina SQR e placebo (hidróxido de sódio), também sob as mesmas condições.

Figura 18- Sobreposição de eletroferogramas de daptomicina SQR e em pó para solução injetável (100 $\mu\text{g/mL}$) obtidos pelo método de eletroforese capilar desenvolvido. Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM; tensão: 15 kV; capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm.

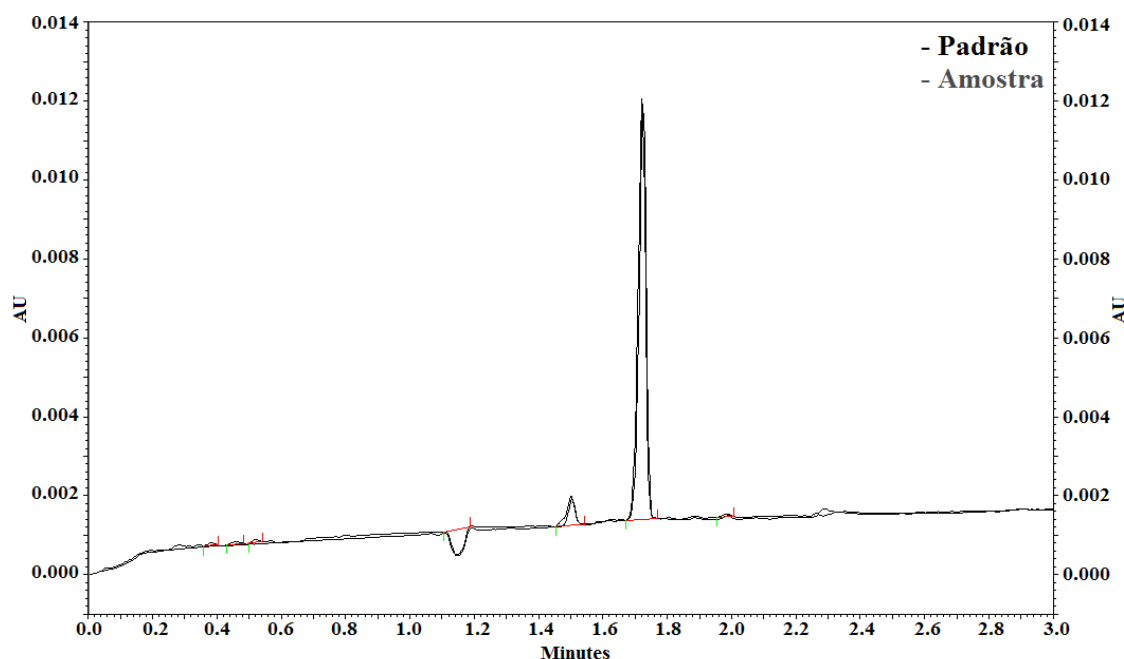
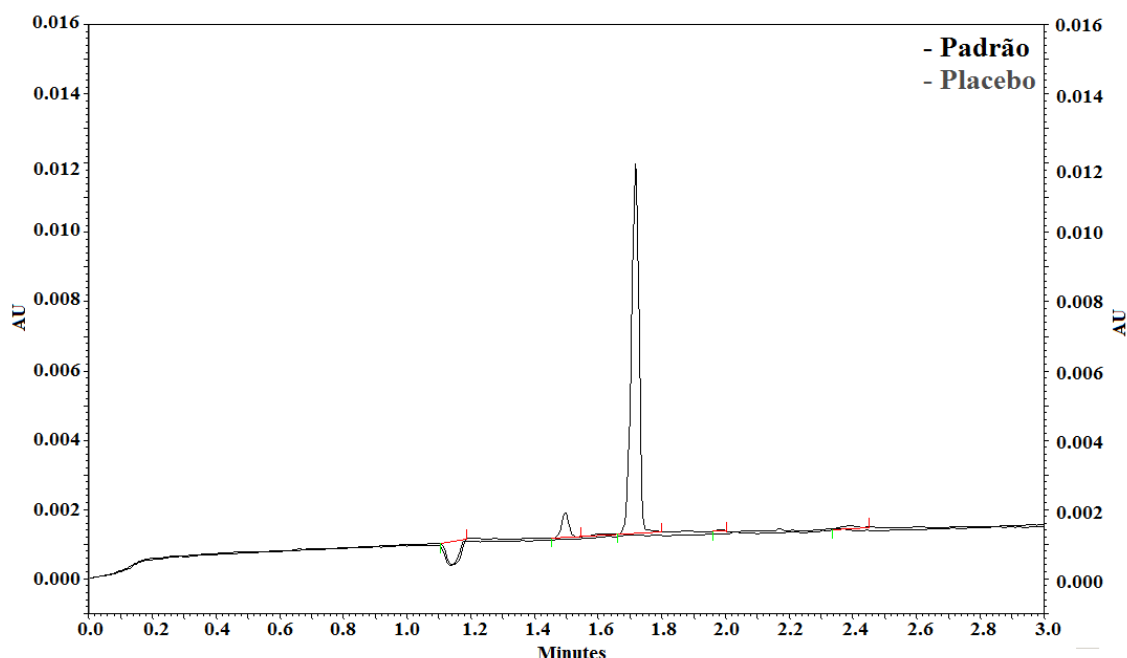


Figura 19- Sobreposição de eletroferogramas de daptomicina SQR e solução de placebo para a análise da seletividade do método de eletroforese capilar desenvolvido. Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM; tensão: 15 kV; capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm.



Também foi preparada uma solução de amostra de daptomicina em pó liofilizado e esta foi analisada pelo software do equipamento de eletroforese capilar quanto à pureza do pico da daptomicina. A pureza encontrada foi de 100%.

5.6.5. Discussão

O desenvolvimento do método se iniciou com a escolha da solução eletrolítica, ou eletrólito de corrida. Optou-se pelo tampão fosfato de potássio por se tratar de uma solução de baixa toxicidade ambiental e ocupacional. Várias concentrações deste tampão foram testadas durante o desenvolvimento do método, e a concentração de 15 mM foi a mais satisfatória por gerar menor corrente elétrica (em torno de 25 μA) e adequada separação.

As concentrações mais altas de tampão fosfato, de 25 e 50 mM, provocaram altas correntes elétricas, em torno de 50 e 80 μA , respectivamente. Normalmente, devido a fatores geométricos do capilar (a relação entre sua área superficial interna e volume é apreciavelmente grande), há uma dissipação eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule). No entanto, altas concentrações de tampão podem gerar altas correntes elétricas, o que compromete a separação pelo excesso de calor decorrente do efeito

Joule, o qual não consegue ser completamente dissipado (TAVARES, 1997). Portanto, as concentrações de 25 e 50 mM não se mostraram adequadas e foram descartadas.

Por outro lado, baixas concentrações de tampão podem aumentar a tendência de adsorção de certos solutos na parede do capilar, causando o alargamento e distorção das bandas (TAVARES, 1997). Isto não ocorreu com a concentração da solução tampão selecionada, de 15 mM.

O pH utilizado para o tampão fosfato de potássio foi de 7,0, pois garantiu uma adequada ionização da molécula e a obtenção de um pico simétrico e reproduzível. Além disso, por se tratar de um pH neutro, causa menos desgaste no equipamento e capilar.

A temperatura do cartucho que continha o capilar foi mantida em 25 °C e se mostrou satisfatória por contribuir para um adequado nível de corrente elétrica, não interferindo na dissipação do calor produzido pelo efeito Joule.

A influência da tensão sobre o método foi investigada no intervalo de 10 a 20 kV. Sob uma tensão de 15 kV, a escolhida para o método, o pico referente à daptomicina foi gerado em um tempo de migração de 1,8 minutos, sendo considerado satisfatório. O tempo de corrida estabelecido foi de 3 minutos.

A água purificada é capaz de solubilizar completamente a daptomicina, portanto foi o diluente escolhido para o preparo das soluções. Além disso, trata-se de um solvente de baixo custo e baixa toxicidade ambiental e ocupacional, contribuindo com o aspecto ambientalmente favorável do método.

O eletrólito de corrida escolhido para as análises apresentava pH 7,0. Como visto na revisão bibliográfica deste antimicrobiano, apresentada anteriormente, a molécula de daptomicina apresenta carga molecular negativa (igual a -3) em pH neutro (JUNG et al., 2004). Em condições normais, como as deste trabalho, o fluxo ocorre do ânodo (eletrodo de carga positiva) em direção ao cátodo (eletrodo de carga negativa), onde encontra-se o detector. Como a molécula de daptomicina, em solução aquosa, encontra-se carregada negativamente, o fluxo eletroosmótico (FEO) foi o responsável por auxiliá-la a migrar pelo capilar em direção ao detector (TAVARES, 1997; FB, 2010; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). Sem o FEO, provavelmente a molécula de daptomicina seria repelida pelo polo negativo, não conseguindo, portanto, migrar.

Após a seleção das melhores condições para o método, foi realizada uma análise de conformidade do sistema e os resultados estão expostos na Tabela 12. Esta análise confirmou que os parâmetros eletroforéticos escolhidos são capazes de fornecer resultados com precisão

e exatidão confiáveis, visto que todos os parâmetros se mantiveram em conformidade com o que é estabelecido pelo FDA (1994). É recomendado que os valores calculados para os fatores de cauda e de assimetria sejam inferiores a 2,0 e o número de pratos deve ser maior do que 2000 (FDA, 1994).

O comprimento de onda de detecção no UV/DAD estabelecido para todas as análises foi de 200 nm. Este comprimento de onda é diferente daquele usado para os métodos de CLAE e UV desenvolvidos neste trabalho. Optou-se por um comprimento de onda mais baixo por gerar picos maiores em comparação com 221 nm. Picos maiores possibilitaram o uso de menores concentrações de daptomicina, o que gerou economia para o método.

Após a etapa de desenvolvimento do método, foi realizada a análise de solução da daptomicina em pó liofilizado para solução injetável, de modo a conferir se o método é adequado para auxiliar na identificação do fármaco na forma farmacêutica. Desta forma, foram preparadas soluções de daptomicina SQR e amostra, nas mesmas concentrações, e estas foram analisadas pelo método proposto. Depois disso, os eletroferogramas obtidos foram comparados entre si e ambos se mostraram idênticos, como pode ser observado na Figura 18.

A análise de uma solução de placebo, constituída por hidróxido de sódio, também foi realizada, para verificar a ausência de interferência desta substância na análise da daptomicina pelo método desenvolvido (Figura 19). Assim, foi possível observar que o hidróxido de sódio não gerou nenhum pico ou interferência na análise do antimicrobiano. Portanto, o método mostrou ser seletivo, o que é essencial para a validação de um método de identificação, conforme descrito pelos guias do ICH e pela RDC nº 899 de 2003 (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Para confirmar a seletividade do método, a pureza do pico da daptomicina obtido com a solução de amostra de pó liofilizado foi analisada no equipamento de eletroforese capilar com detecção UV/DAD. O pico de daptomicina mostrou pureza de 100%, comprovando que não há nenhuma interferência dos componentes da sua matriz na análise. Este fato confirma a seletividade do método.

Em etapa posterior do trabalho, a capacidade indicativa de estabilidade deste método também será demonstrada, durante desenvolvimento e validação de método quantitativo para análise da daptomicina por meio de eletroforese capilar.

O método de eletroforese capilar desenvolvido se mostrou eficiente e pode ser usado em conjunto com outras técnicas para auxiliar na identificação da daptomicina na forma

farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável em análises de rotina do Controle de Qualidade deste fármaco.

5.7. Espectrofotometria na região do infravermelho médio

5.7.1. Considerações gerais

O fundamento de técnicas espectrofotométricas é a absorção da energia eletromagnética por moléculas, o que normalmente depende da estrutura e concentração das mesmas. A divisão da espectrofotometria nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho, depende do intervalo de frequência em que a energia eletromagnética é aplicada (FB, 2010).

A radiação infravermelha (IR) se encontra na região do espectro eletromagnético situada entre o visível e das micro-ondas. Dentro desta faixa, a porção de maior utilidade para a identificação de compostos está situada entre 4000 e 400 cm^{-1} , a qual corresponde ao infravermelho médio (ou vibracional) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). A Farmacopeia Brasileira (FB, 2010) menciona a espectrofotometria no infravermelho médio como ensaio de identificação por excelência.

Cada tipo de ligação química presente em uma molécula possui uma frequência natural de vibração. No entanto, duas ligações químicas que são idênticas, mas estão presentes em moléculas diferentes (e, portanto, em ambientes levemente diferentes também), nunca apresentarão espectros no infravermelho exatamente idênticos, mesmo considerando que as frequências absorvidas em ambos os casos sejam iguais. Desta forma, os espectros infravermelhos podem ser considerados como impressões digitais para moléculas, já que duas substâncias diferentes nunca apresentarão padrões de absorção no infravermelho idênticos. Se os espectros de duas substâncias se coincidirem, banda a banda, quando comparados, na maioria das vezes as duas substâncias serão idênticas (PAVIA et al., 2010).

Outra utilidade do infravermelho médio é fornecer informações estruturais de uma molécula. Cada tipo de ligação (por exemplo, N-H, C-H, C=O, C-O, etc.) apresenta absorção encontrada apenas em certas pequenas regiões do infravermelho vibracional. Assim, uma pequena faixa de absorção pode ser definida para cada tipo de ligação. Quando a absorção se encontra fora desta faixa, normalmente se atribui a outro tipo de ligação (PAVIA et al., 2010). A presença destas bandas características é que permite ao analista, através de exame do espectro e consulta a tabelas, obter informações estruturais úteis para auxiliá-lo na

determinação da estrutura molecular e, portanto, na identificação da molécula (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Trata-se de uma técnica que não utiliza solventes orgânicos em suas análises, sendo considerada, portanto, ambientalmente favorável. Além disso, o consumo de materiais para cada análise é muito baixo, tornando o método também econômico (TÓTOLI; SALGADO, 2012). Ao mesmo tempo, oferece vantagens quanto ao preparo das amostras na forma sólida, já que estas podem ser analisadas na forma de pastilhas de brometo de potássio contendo o analito, apropriadas para fármacos com problemas de solubilidade (MORENO; SALGADO, 2012).

Considerando sua excelência para a identificação de compostos e suas vantagens ambientais e econômicas, o objetivo desta etapa do trabalho foi desenvolver um método qualitativo de espectrofotometria na região do infravermelho médio para a análise da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável. Além disso, esta etapa do trabalho serviu como base para o desenvolvimento e validação de método quantitativo por espectrofotometria na região do infravermelho médio, que será descrito na seção “Análise Quantitativa”.

5.7.2. Material

A daptomicina SQR e amostra de pó liofilizado para solução injetável utilizadas foram descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. Hidróxido de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foi empregado para avaliar a seletividade do método. Para a confecção das pastilhas, foi utilizado brometo de potássio (KBr) de grau analítico da marca Synth (Diadema, Brasil). Antes de sua utilização o KBr foi dessecado a 105 °C em estufa Quimis (Diadema, Brasil) modelo 702.780.

O equipamento de infravermelho empregado foi Shimadzu (Kyoto, Japão), com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21, que permite a digitalização de espectros e a obtenção de arquivos eletrônicos das análises. As análises foram realizadas na faixa do infravermelho médio, compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} , em transmitância.

5.7.3. Método

5.7.3.1. Preparo da pastilha de daptomicina SQR

Foi preparada pastilha de KBr contendo daptomicina SQR na concentração de 0,4 mg/150 mg. Primeiramente, uma diluição de 1:100 (p/p) de daptomicina SQR em KBr foi realizada, para minimizar erros de pesagem. Para isso, foram pesados 20,0 mg de daptomicina SQR, que foram misturados a 1980,0 mg de KBr. Os pós foram misturados geometricamente em gral de ágata até a obtenção de uma mistura homogênea. Depois disso, esta diluição foi levada à estufa a 105 °C por 10 minutos. Após este período, a diluição foi levada a dessecador até atingir temperatura ambiente.

A partir desta diluição, 40 mg foram pesados (os quais representam 0,4 mg de daptomicina) e depois homogeneizados com 110 mg de KBr, para se obter a pastilha com massa total de 150 mg. Os pós foram misturados e moídos em gral de ágata até a obtenção de uma mistura homogênea. Depois disso, esta mistura foi comprimida em prensa mecânica por 10 minutos para obtenção de pastilha translúcida, a qual foi analisada no espectrofotômetro de infravermelho. As leituras foram realizadas em transmitância.

5.7.3.2. Preparo da pastilha de daptomicina amostra

Foi preparada pastilha de KBr contendo daptomicina na concentração teórica de 0,4 mg/150 mg. Para isso, primeiramente foi verificado o peso médio de três frascos-ampola de daptomicina (descritos no item 4.3) e preparado um *pool* de amostras, conforme descrito no item 5.3.2.1.3.1. A partir deste *pool*, foi realizada uma diluição de 1:100 (p/p) de daptomicina em KBr, para minimizar erros de pesagem. Assim, foi pesado o equivalente a 20,0 mg de daptomicina, o qual foi misturado a KBr em quantidade suficiente para a obtenção de 2000 mg da mistura diluída. Os pós foram misturados geometricamente em gral de ágata até a obtenção de uma mistura homogênea. Depois disso, esta diluição foi levada à estufa a 105 °C por 10 minutos. Após este período, a diluição foi levada a dessecador até atingir temperatura ambiente.

A partir desta diluição, 40 mg foram pesados (os quais representam 0,4 mg de daptomicina) e depois homogeneizados com 110 mg de KBr, para se obter uma pastilha com massa total de 150 mg. Os pós foram misturados e moídos em gral de ágata até a obtenção de uma mistura homogênea. Depois disso, esta mistura foi comprimida em uma prensa mecânica

por 10 minutos para obtenção de uma pastilha translúcida, a qual foi analisada no espectrofotômetro de infravermelho. As leituras foram realizadas em transmitância.

5.7.3.3. Análise da amostra de daptomicina e seletividade do método

Foi realizada a análise da seletividade do método, para verificar se há interferência do excipiente nas análises e assim validar o método qualitativo conforme os guias do ICH e RDC 899 de 2003 (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Para isso, foi preparada uma pastilha de placebo, constituído apenas por hidróxido de sódio, na concentração de 1,0 mg/150 mg. Deste modo, foi realizada a pesagem de 1,0 mg de hidróxido de sódio, o qual foi misturado com 149,0 mg de KBr, para se obter uma pastilha com massa total de 150 mg. Os pós foram misturados e moídos em gral de ágata até a obtenção de uma mistura homogênea. Depois disso, esta mistura foi comprimida em uma prensa mecânica por 10 minutos para obtenção de uma pastilha translúcida, a qual foi analisada no espectrofotômetro de infravermelho médio e seu espectro foi comparado ao obtido com a pastilha de daptomicina SQR, para verificar se há alguma interferência do excipiente na análise da daptomicina. Esta etapa também foi importante para determinar a faixa espectral a ser utilizada no desenvolvimento e validação de método quantitativo no infravermelho médio, que será descrito posteriormente. Para isso, o ideal é escolher uma faixa espectral sem nenhuma interferência do adjuvante.

Além disso, os espectros obtidos com as pastilhas de daptomicina SQR e amostra também foram analisados e comparados.

Enfim, uma análise do espectro de daptomicina SQR foi realizada, para identificar suas principais bandas de absorção, de acordo com dados da literatura (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2010).

5.7.4. Resultados

A Figura 20 apresenta a sobreposição dos espectros no infravermelho obtidos com a daptomicina SQR e amostra. Já a Figura 21 mostra a sobreposição dos espectros obtidos com a daptomicina SQR e placebo (hidróxido de sódio). Na Figura 21 também é possível observar a região espectral escolhida para o posterior desenvolvimento e validação de método quantitativo para análise de daptomicina em pó liofilizado.

Figura 20- Sobreposição de espectros de absorção na região do infravermelho médio de daptomicina SQR e em pó para solução injetável (0,4 mg/150 mg).

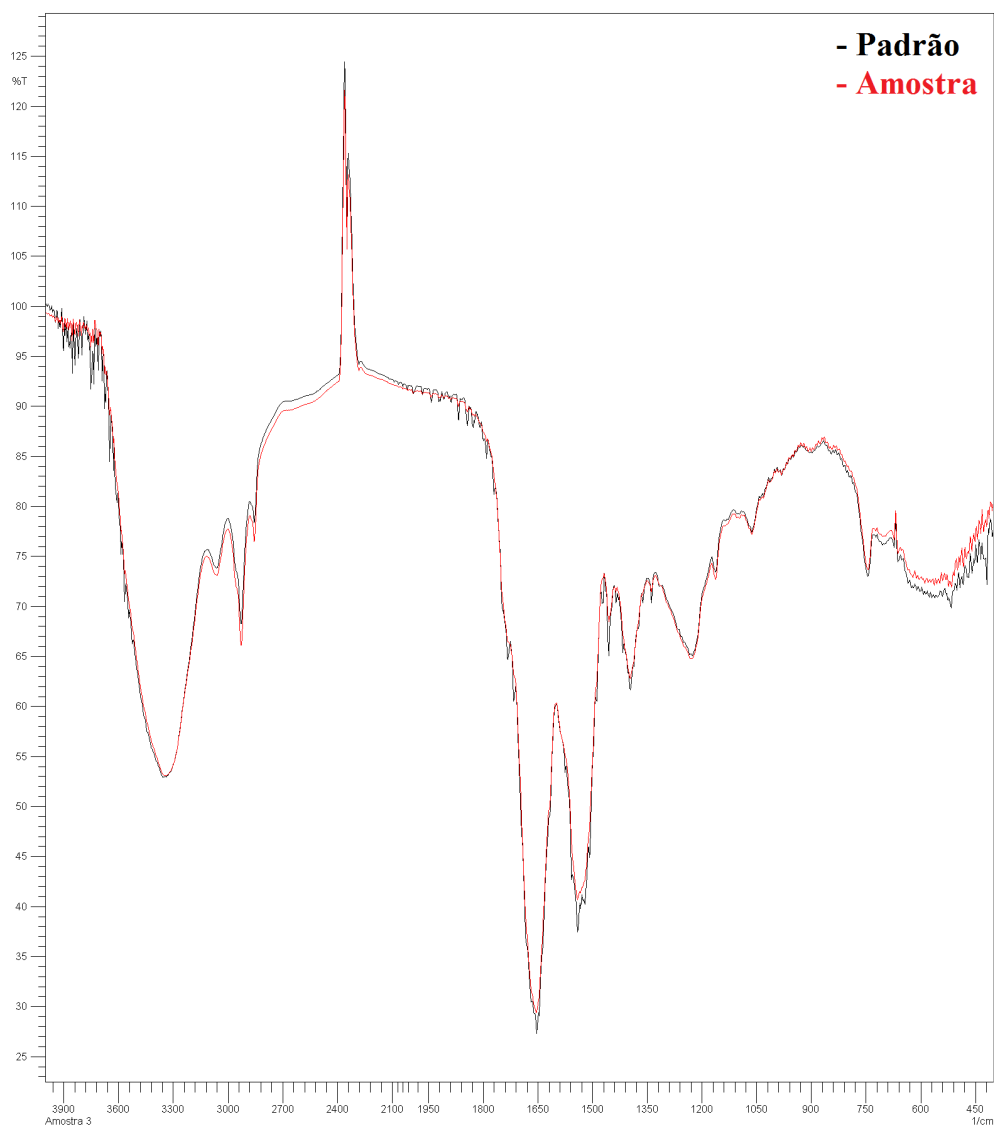
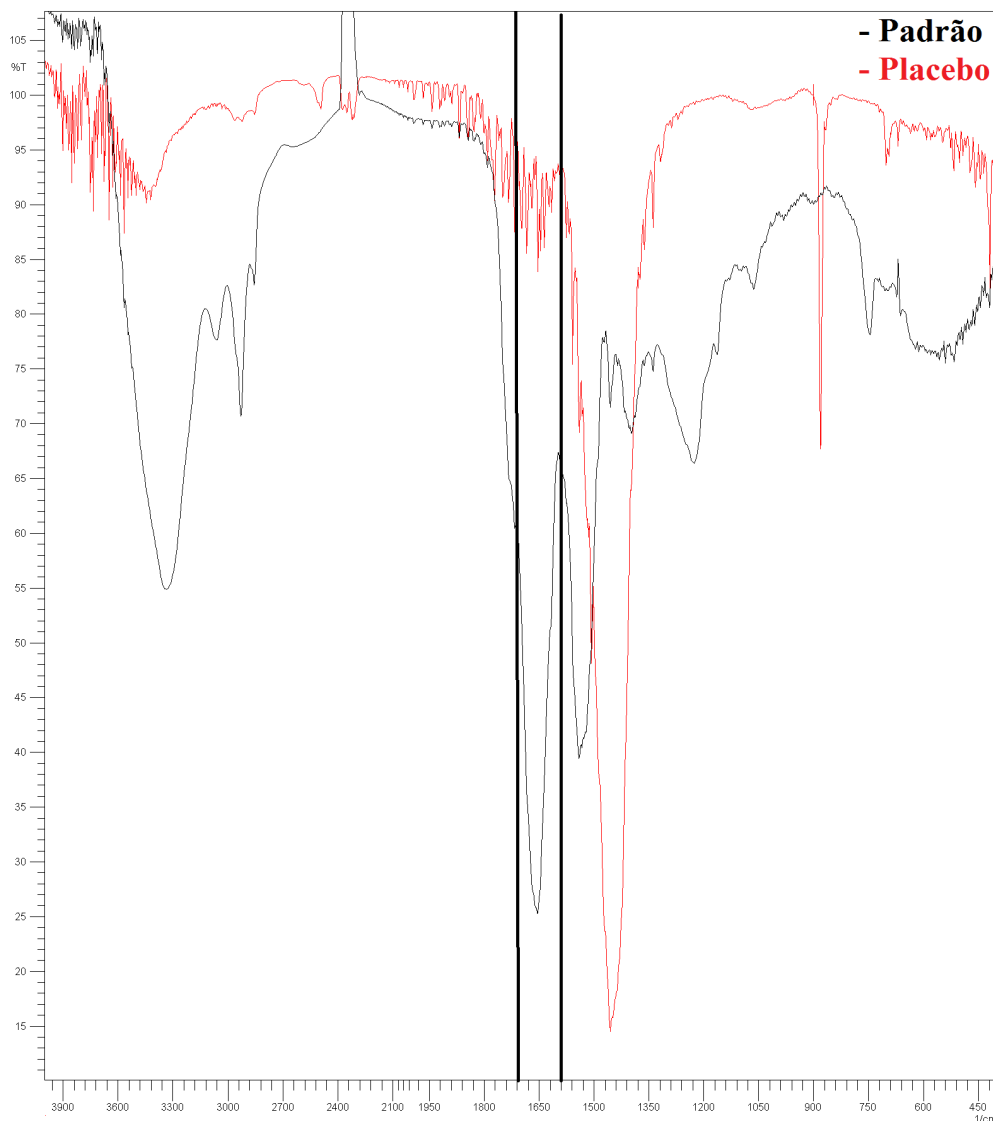


Figura 21- Sobreposição de espectros de absorção na região do infravermelho médio de daptomicina SQR (0,4 mg/150 mg) e placebo (1,0 mg/150 mg), com a delimitação da região escolhida para análise quantitativa (de 1700 a 1600 cm^{-1}).



A Figura 22 mostra um espectro de absorção da daptomicina SQR com as suas principais bandas de absorção marcadas. A Tabela 13 compara estes dados com os apresentados na literatura (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2010).

Figura 22- Espectro de absorção na região do infravermelho médio de daptomicina SQR (0,4 mg/150 mg) com suas principais bandas de absorção marcadas.

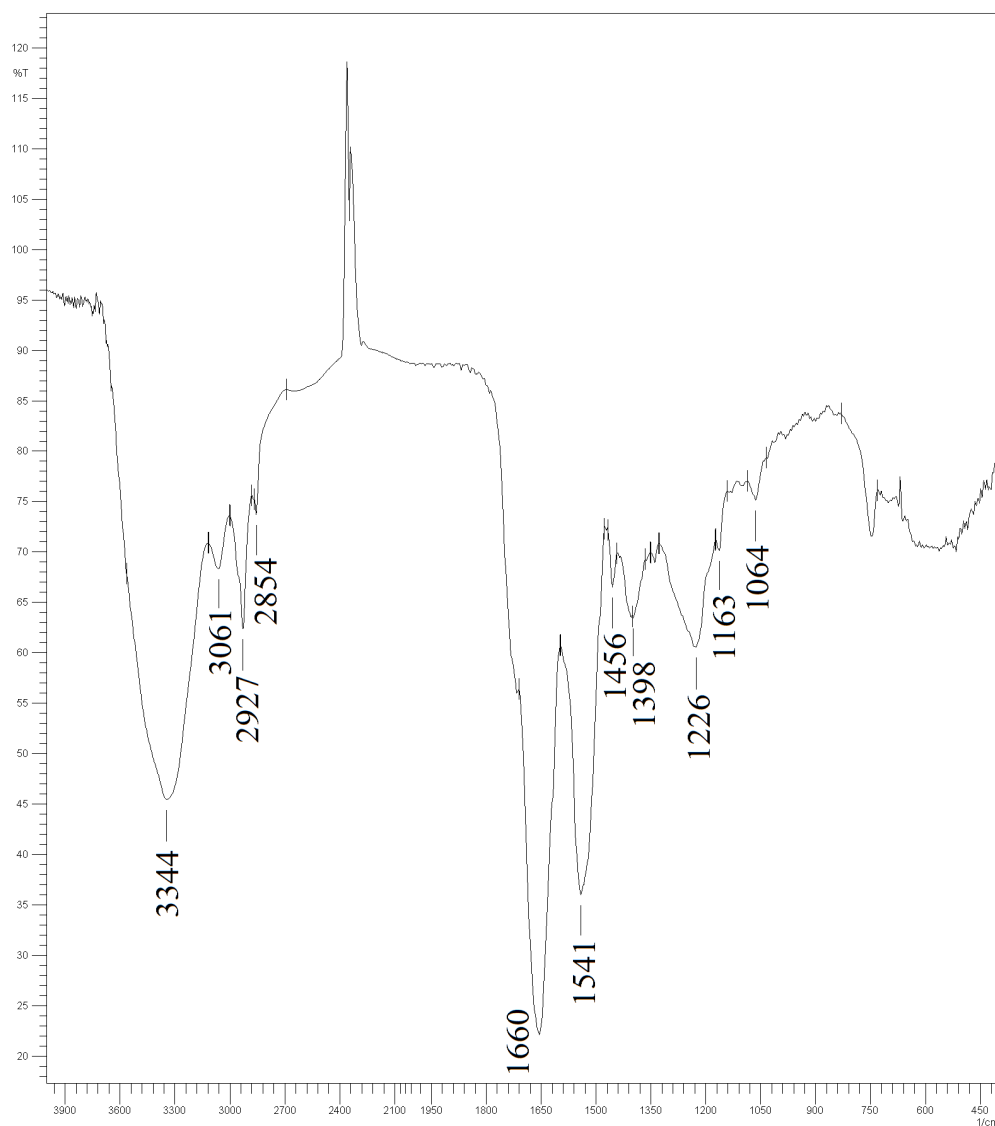


Tabela 13- Comparação das bandas de absorção apresentadas pela daptomicina SQR na região do infravermelho médio com dados apresentados na literatura

Frequências visualizadas (cm ⁻¹)	Faixa de frequências de referência (cm ⁻¹) ¹	Possíveis grupamentos responsáveis
	3400-2400	O-H (ácido carboxílico)
3344	3475-3150	Estiramento N-H (amidas primária e secundária)
3061	3100-3000	C _{sp2} -H
2927; 2854	3000-2850	C _{sp3} -H
1660	1680-1630	C=O (amidas primária e secundária)
	1640-1550	Dobramento N-H (amidas primária e secundária)
1541	Próximo a 1500	Dobramento N-H (amina secundária)
1456	1600-1450 ²	C=C (anel aromático)
1398	1440-1220	C-O (álcool primário)
	1320-1210	C-O (ácido carboxílico)
1226	1440-1220	C-O (álcool primário)
1163	1300-1000 ³	C-O (éster)
1064	1350-1000	Estiramento N-H (aminas primária e secundária)

¹ PAVIA et al., 2010

² Podem aparecer até 4 bandas dentro desta faixa

³ Podem aparecer duas bandas nesta faixa

5.7.5. Discussão

Os espectros de absorção da daptomicina SQR e amostra de pó liofilizado foram comparados, banda a banda. Conforme observado na Figura 20, ambos os espectros apresentaram as mesmas bandas de absorção, e este fato é um forte indício da identidade da daptomicina na amostra de pó liofilizado e da ausência de interferência do adjuvante, impurezas ou produtos de degradação, os quais apresentariam bandas diferentes.

A Figura 21 apresenta uma sobreposição dos espectros de absorção da daptomicina SQR e placebo, constituído por hidróxido de sódio. O objetivo desta etapa do estudo foi definir uma faixa espectral que não haja interferência do excipiente para o desenvolvimento

de método quantitativo, em uma próxima etapa do trabalho. Desta forma, a faixa espectral compreendida entre 1700 e 1600 cm^{-1} foi escolhida por não ser afetada pelo adjuvante. Esta faixa corresponde à banda de uma das carbonilas da molécula de daptomicina. Além de não ter interferência do excipiente, esta banda é forte, o que permite a definição de menores concentrações de trabalho durante o desenvolvimento do método quantitativo.

Vale lembrar que a pastilha com o hidróxido de sódio foi preparada na concentração de 1,0 mg/150 mg, e esta concentração é consideravelmente maior que aquela presente em uma pastilha de 0,4 mg/150 mg de daptomicina, a qual foi usada como comparação. Esta concentração foi escolhida apenas para facilitar a análise e é considerada suficiente, já que é maior que a concentração necessária e torna mais evidentes as bandas de absorção geradas.

De acordo com a análise do espectro de absorção da daptomicina SQR (Figura 22), todas as bandas encontradas estão de acordo com a literatura, conforme apresentado na Tabela 13. Apesar disso, alguns pontos desta análise merecem destaque. A molécula de daptomicina possui diferentes grupos funcionais, entre eles: alceno, alceno, anel aromático, amidas primária e secundária, ácido carboxílico, amins primária e secundária, cetona, éster e álcool primário. A amida secundária se destaca por aparecer com grande frequência na molécula.

Foi observada uma banda forte em 3344 cm^{-1} . Esta banda pode ser proveniente tanto do estiramento O-H proveniente dos ácidos carboxílicos presentes na molécula, como dos estiramentos N-H presentes nas amidas primárias e secundárias. No entanto, provavelmente esta banda é oriunda do estiramento O-H do ácido carboxílico, por ser, normalmente, maior que aquela proveniente de estiramentos N-H. Uma sobreposição de bandas nesta faixa espectral pode ter ocorrido.

Em 1660 cm^{-1} existe uma banda forte, oriunda das carbonilas presentes nas amidas primárias e secundárias. Nota-se que outros grupos funcionais presentes na molécula de daptomicina também apresentam carbonilas, mas apenas aquelas provenientes de amidas se apresentam na faixa de 1680-1630 cm^{-1} . Carbonilas oriundas de ácidos carboxílicos aparecem na faixa de 1730-1700 cm^{-1} ; de ésteres, na faixa de 1750-1735 cm^{-1} ; e de cetonas, de 1700-1680 cm^{-1} (PAVIA et al., 2010). Desta forma, a banda que aparece em 1660 cm^{-1} só pode ser decorrente das carbonilas presentes nas amidas primárias e secundárias da molécula. Vale lembrar que as amidas estão presentes em maior número na molécula.

A banda que aparece em 1226 cm^{-1} possui duas alternativas, podendo ser oriunda do estiramento C-O tanto do álcool primário quanto do éster, ambos presentes na molécula.

Assim, pode-se concluir que o método de espectrofotometria na região do infravermelho médio é uma útil ferramenta para auxiliar na identificação da daptomicina em amostras de pó liofilizado. Além disso, trata-se de um método rápido, econômico e que não utiliza solventes orgânicos para suas análises, gerando menos resíduos deste tipo e, por tal motivo, sendo considerado um método ambientalmente favorável.

6. ANÁLISE QUANTITATIVA

6.1. Espectrofotometria na região do UV

6.1.1. Considerações gerais

A espectrofotometria na região do UV é um método instrumental muito usado para a quantificação de fármacos, por ser considerado simples, rápido, econômico e reprodutível (MORENO; SALGADO, 2009; FIORENTINO; SALGADO, 2012; SILVA; ALMEIDA; SALGADO, 2012; PEDROSO; SALGADO, 2013).

As técnicas espectrofotométricas, em geral, são baseadas na absorção da energia eletromagnética por moléculas. Esta absorção depende tanto da concentração quanto da estrutura química das mesmas (FB, 2010). Basicamente, quando uma radiação contínua atravessa um material transparente, uma parte dela pode ser absorvida. À medida que isto acontece, a radiação residual, ao atravessar o prisma, produzirá um espectro, denominado “espectro de absorção”. Ao absorverem energia, átomos ou moléculas passam de um estado de energia mais baixa, denominado estado fundamental, para um estado de energia maior, denominado estado excitado, e a diferença destes dois estados é igual à energia da radiação eletromagnética absorvida (PAVIA et al., 2010). Estas transições de energia do estado fundamental para o excitado ocorrem em porções da molécula chamadas de cromóforos (FB, 2010).

O princípio da análise quantitativa por espectrofotometria na região do UV é a relação direta que existe entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da substância, também conhecida como lei de Lambert-Beer, que é representada pela Equação 6 (ROCHA; TEIXEIRA, 2004; FB, 2010).

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Equação 6

Em que:

A = absorvância

I_0 = intensidade da radiação monocromática que incide na amostra

I = intensidade da radiação que emerge da amostra

ε = é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente

c = concentração da espécie absorvente (mol/L)

b = distância percorrida pelo feixe através da amostra (cm)

Na literatura, não foram encontrados trabalhos que descrevem o desenvolvimento e validação de método analítico quantitativo por espectrofotometria no UV para a análise da daptomicina em nenhum tipo de matriz, seja biológica ou produto farmacêutico. Considerando todas as vantagens que este método oferece, esta etapa do trabalho teve como objetivo desenvolver um método quantitativo por espectrofotometria no UV para análise da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável.

6.1.2. Material

Para a análise espectrofotométrica, foram utilizadas daptomicina SQR e daptomicina em pó liofilizado para preparações injetáveis descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. As análises foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu® (Kyoto, Japão), modelo UV-1800, e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O solvente utilizado foi água purificada (obtida por osmose reversa - Millipore, Billerica, EUA). O *software Microsoft Excel* (2013) foi utilizado para a construção das curvas analíticas.

Para avaliação da robustez do método, foi utilizado espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu® (Kyoto, Japão), modelo UV mini-1240 e água purificada obtida pelo equipamento Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, EUA).

Os seguintes materiais também foram utilizados: balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo, Barueri, Brasil) e micropipetador modelo 20-200 μ L (Digipet, Curitiba, Brasil).

6.1.3. Método

6.1.3.1. Ensaios preliminares e construção da curva de Ringbom

Para o desenvolvimento do método quantitativo, foram utilizados os parâmetros definidos na análise qualitativa por espectrofotometria na região do UV, descrita anteriormente. Desta forma, foram escolhidos a água como solvente e 221 nm como o comprimento de onda de trabalho.

Foi construída a curva de Ringbom com objetivo de estabelecer a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico apresenta melhor linearidade. Para isso,

primeiro foi preparada a solução estoque de daptomicina SQR na concentração de 100 µg/mL. Assim, o equivalente a 5,0 mg de daptomicina SRQ foi pesado e transferido analiticamente para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água purificada, resultando em solução de 100 µg/mL. A partir desta solução estoque, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL, cujos volumes foram completados também com água purificada, obtendo soluções em concentrações crescentes, de 1,0 a 35 µg/mL, como apresentado na Tabela 14. Cada concentração foi preparada em triplicata e as análises espectrofotométricas foram determinadas no comprimento de onda de 221 nm, utilizando água purificada para zerar o equipamento.

Tabela 14- Obtenção da curva de Ringbom para a determinação da faixa de linearidade do método espectrofotométrico na região do UV para análise de daptomicina a 221 nm

Amostra	Volume da solução de daptomicina SQR (100 µg/mL) (mL)	Concentração final (µg/mL) ¹
1	0,05	1,0
2	0,10	2,0
3	0,15	3,0
4	0,20	4,0
5	0,25	5,0
6	0,30	6,0
7	0,35	7,0
8	0,40	8,0
9	0,45	9,0
10	0,50	10,0
11	0,60	12,0
12	0,70	14,0
13	0,75	15,0
14	0,80	16,0
15	0,90	18,0
16	1,00	20,0
17	1,05	21,0
18	1,10	22,0
19	1,20	24,0
20	1,30	26,0
21	1,50	30,0
22	1,75	35,0

¹ Balão volumétrico de 5 mL

Após a determinação das absorvâncias para cada concentração testada, estes valores foram convertidos para transmitância (T%) e foram plotados em gráfico de 100-T% *versus* o

log da concentração de daptomicina em $\mu\text{g/mL}$, com auxílio do *software Microsoft Excel* (2013).

6.1.3.2. Obtenção da curva analítica

Para a construção da curva analítica, foi pesado analiticamente o equivalente a 5,0 mg de daptomicina SQR, depois esta massa foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água, para obtenção de solução estoque com concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas de 0,30; 0,45; 0,60; 0,75; 0,90 e 1,05 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL, e os volumes foram completados com água, para obtenção das soluções de trabalho com as concentrações de 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 18,0 e 21,0 $\mu\text{g/mL}$ de daptomicina SQR. Cada concentração foi preparada em triplicata e as análises espectrofotométricas foram determinadas no comprimento de onda de 221 nm, utilizando água purificada para zerar o equipamento. A curva analítica foi construída, com auxílio do *software Microsoft Excel* (2013), através da disposição das concentrações das soluções de trabalho de daptomicina SQR em relação às respectivas médias das absorvâncias obtidas para cada uma delas. Este procedimento foi realizado três dias diferentes e uma curva analítica final com a média dos três dias foi construída.

6.1.3.3. Determinação de daptomicina na amostra de pó liofilizado para solução injetável

6.1.3.3.1. Preparo da solução de daptomicina SQR

Primeiro foi preparada a solução estoque de daptomicina SQR na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, como descrito no item 6.1.3.2. Foram transferidos volumes de 0,6 mL desta solução estoque para balões volumétricos com capacidade de 5 mL e os volumes foram completados com água purificada para obtenção de soluções de trabalho com a concentração de 12,0 $\mu\text{g/mL}$. Foram preparadas três soluções e a análise das suas absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 221 nm.

6.1.3.3.2. Preparo da solução de daptomicina amostra

Foi preparada uma solução estoque de daptomicina amostra na concentração teórica de 100 $\mu\text{g/mL}$. Para isso, primeiramente foi verificado o peso médio de três frascos-ampola de daptomicina (descritos no item 4.3) e preparado um *pool* de amostras, conforme descrito no

item 5.3.2.1.3.1. A partir deste *pool*, o equivalente a 5,0 mg de daptomicina foi analiticamente pesado e transferido para balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completado com água purificada para obtenção de solução estoque de 100 µg/mL.

Para balões volumétricos com capacidade de 5 mL foram transferidos volumes de 0,6 mL desta solução estoque e os volumes foram completados com água purificada para obtenção de soluções de trabalho com a concentração teórica de 12,0 µg/mL. Foram preparadas três soluções e a análise das suas absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 221 nm.

6.1.3.3.3. Cálculo do teor de daptomicina na amostra

A concentração de daptomicina na amostra foi calculada pela Equação 7 e o seu teor percentual foi calculado pela Equação 8.

$$C_a = A_a \times \frac{C_{sr}}{A_{sr}} \quad \text{Equação 7}$$

$$Ca\% = C_a \times \frac{100}{C_t} \quad \text{Equação 8}$$

Em que:

C_a = concentração da amostra (µg/mL)

$Ca\%$ = concentração percentual da amostra

C_{sr} = concentração da substância química de referência (µg/mL)

A_a = área absoluta da amostra

A_{sr} = área absoluta da substância química de referência

C_t = concentração teórica de daptomicina na amostra (µg/mL)

6.1.3.4. Validação do método

O método foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade e limites de detecção e de quantificação, de acordo com o preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014).

6.1.3.4.1. Linearidade

Para a análise da linearidade do método, foram avaliadas três curvas analíticas, realizadas em três dias diferentes. Cada curva foi construída de acordo com o descrito no item 6.1.3.2. Os resultados obtidos foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada por análise de variância (ANOVA).

6.1.3.4.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois quesitos: a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade (intradia) foi estudada através da análise de seis soluções de daptomicina SQR na concentração de 12,0 µg/mL, no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. O valor do desvio padrão relativo percentual (DPR%) entre as determinações foi avaliado. A precisão intermediária (interdias e entre-analistas), por sua vez, foi avaliada pela determinação do teor de daptomicina na amostra de pó para solução injetável em três dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados (ICH, 2005).

6.1.3.4.3. Exatidão

A exatidão do método foi realizada pelo ensaio de recuperação, no qual quantidades conhecidas de daptomicina SQR foram adicionadas a quantidades conhecidas de amostra (ICH, 2005). A recuperação foi realizada em três níveis, R1, R2 e R3, e as soluções foram preparadas segundo a Tabela 15, em triplicata.

Tabela 15- Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico na região do UV para daptomicina

	Daptomicina amostra (100 µg/mL) (mL)	Daptomicina SQR (100 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL) ^{1,2}
Amostra	0,30	-	6,0
R1	0,30	0,18	9,6
R2	0,30	0,30	12,0
R3	0,30	0,42	14,4
Padrão	-	0,30	6,0

¹ Balão volumétrico de 5 mL

² Cada nível de concentração foi preparado em triplicata

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada pela Equação 9, determinada pela AOAC (AOAC, 2002):

$$R\% = \left[\frac{(C_R - C_A)}{C_P} \right] \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Na qual:

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 adicionada da solução de SQR ($\mu\text{g/mL}$)

6.1.3.4.4. Robustez

Para a avaliação da robustez do método, os seguintes parâmetros foram variados individualmente: comprimento de onda (2 unidades de comprimento de onda acima e abaixo do comprimento de onda de trabalho), equipamento (UV-Vis Shimadzu, modelo UV mini-1240) e fonte de água (Milli-Q). Para isso, foram realizados doseamentos de daptomicina na amostra de pó para solução injetável nas diferentes condições propostas. As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao DPR% entre as determinações, comparando-as com as condições normais de trabalho.

6.1.3.4.5. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de espectrofotometria no UV, descrito no item 5.4.3.2.

6.1.3.4.6. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva, conforme descrito na literatura (ICH, 2005). Foram realizadas três curvas analíticas diferentes para a obtenção dos dados necessários para os cálculos. Os valores de LD e LQ foram estimados pelas Equações 10 e 11, respectivamente.

$$LD = \frac{3,3\sigma}{IC} \quad \text{Equação 10}$$

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

Equação 11

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva analítica

6.1.4. Resultados

6.1.4.1. Ensaios preliminares e construção da curva de Ringbom

As características do espectro de absorção da solução de daptomicina utilizando água purificada como solvente encontra-se na Figura 7 e foi discutida na seção 5.4.5, durante o desenvolvimento do método qualitativo para análise da daptomicina por espectrofotometria no UV.

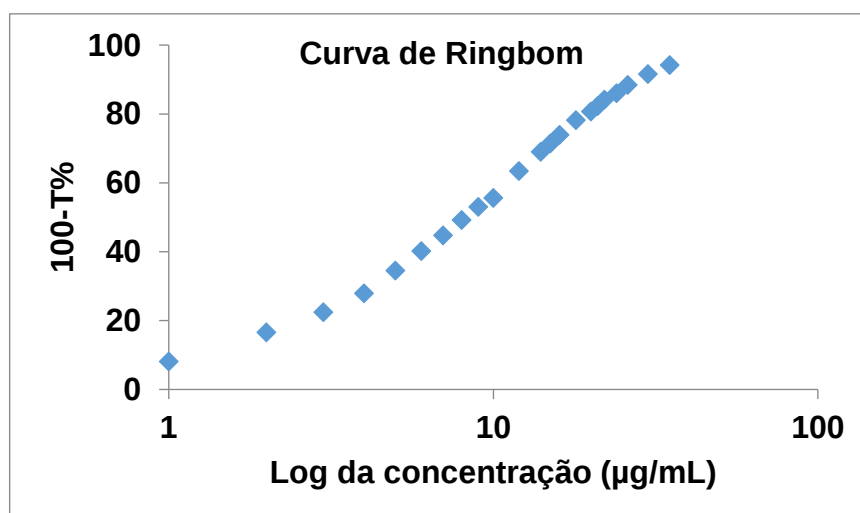
Quanto à curva de Ringbom, os resultados obtidos para a determinação da faixa linear do método espectrofotométrico na região do UV para a daptomicina estão apresentados na Tabela 16 e sua representação gráfica está disposta na Figura 23.

Tabela 16- Valores obtidos na construção da curva de Ringbom pelo método espectrofotométrico na região do UV para daptomicina SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 221 nm

Concentração de daptomicina SQR ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância ¹	100-T%
1,0	0,037	8,096
2,0	0,079	16,568
3,0	0,110	22,435
4,0	0,142	27,945
5,0	0,184	34,536
6,0	0,223	40,159
7,0	0,257	44,707
8,0	0,294	49,223
9,0	0,328	53,011
10,0	0,353	55,639
12,0	0,436	63,384
14,0	0,508	68,954
15,0	0,544	71,424
16,0	0,584	73,918
18,0	0,662	78,206
20,0	0,716	80,754
21,0	0,751	82,258
22,0	0,801	84,188
24,0	0,854	86,004
26,0	0,935	88,386
30,0	1,076	91,599
35,0	1,233	94,152

¹ Este valor é a média de três determinações

Figura 23- Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV para daptomicina SQR, utilizando água como solvente no comprimento de onda de 221 nm.



6.1.4.2. Validação do método

6.1.4.2.1. Linearidade

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de daptomicina SQR, em água, para a construção da curva analítica estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17- Valores de absorvância determinados para a curva analítica de daptomicina SQR, pelo método espectrofotométrico na região do UV, utilizando água como solvente, a 221 nm

Concentração (µg/mL)	Absorvância ¹	Absorvância média ± DP ²	DPR ³ (%)
6,0	0,186	0,187 ± 0,0026	1,38
	0,190		
	0,185		
9,0	0,279	0,281 ± 0,0018	0,65
	0,283		
	0,282		
12,0	0,368	0,369 ± 0,0049	1,33
	0,374		
	0,365		
15,0	0,462	0,457 ± 0,0075	1,64
	0,460		
	0,448		
18,0	0,547	0,545 ± 0,0037	0,67
	0,547		
	0,541		
21,0	0,637	0,639 ± 0,0056	0,87
	0,645		
	0,635		

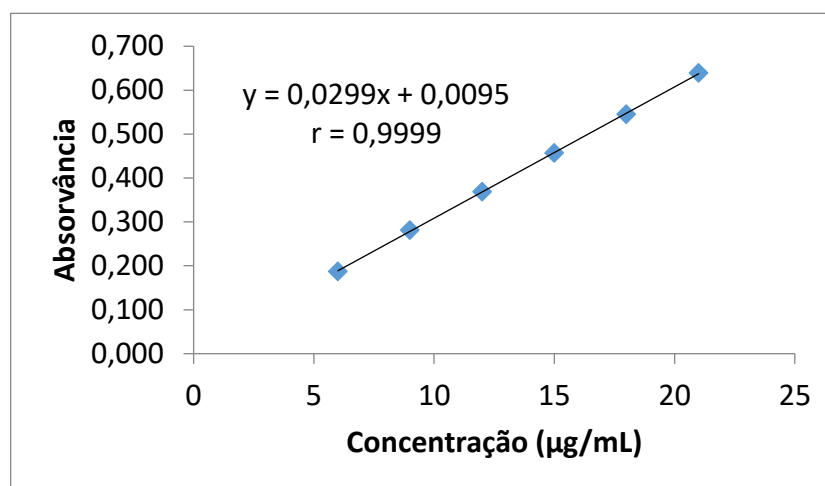
¹ Valor médio de três determinações

² DP: desvio padrão

³ DPR: desvio padrão relativo

A curva analítica de daptomicina SQR (Figura 24) foi construída com as médias dos valores de absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade.

Figura 24- Curva analítica de daptomicina SQR, obtida pelo método de espectrofotometria na região do UV, utilizando água como solvente, a 221 nm.



A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de daptomicina SQR está apresentada na Tabela 18.

Tabela 18- Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de daptomicina SQR, utilizando o método espectrofotométrico na região do UV

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	0,422324	0,084465	3764,32*	3,11
Regressão linear	1	0,422294	0,422294	18820,25*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,000030	0,000008	0,33	3,26
Resíduo	12	0,000269	0,000022	-	-
Total	17	0,422593	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05$

6.1.4.2.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em três parâmetros: intradia, interdias e entre-analistas. Os resultados foram expressos com base nos valores de DPR percentuais. A

precisão intradia forneceu um valor de DPR de 1,20%. Os valores percentuais de DPR apresentados pelos parâmetros interdias e entre-analistas estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19- Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método espectrofotométrico na região do UV para análise de daptomicina em pó liofilizado

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre-analistas		
		Massa ¹ (g/frasco)	Teor ¹ (%)	DPR ² (%)		Massa ¹ (g/frasco)	Teor ¹ (%)	DPR ² (%)
1	1	0,507	101,45	1,46	1	0,519	103,74	0,13
	2	0,514	102,76					
	3	0,499	99,80		2	0,518	103,55	

¹ média de três determinações

² DPR = desvio padrão relativo

6.1.4.2.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, o qual foi realizado em três níveis de concentração e os resultados estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20- Determinação da exatidão do método analítico para análise de daptomicina por espectrofotometria na região do UV

	Daptomicina SQR adicionada (µg/mL)	Daptomicina SQR encontrada ¹ (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR ² (%)	Recuperação média (%)
R1	3,60	3,60	100,00	1,43	99,94
R2	6,00	5,97	99,58	0,03	
R3	8,40	8,42	100,23	1,06	

¹ média de três determinações

² DPR = desvio padrão relativo (dentro de cada nível de recuperação)

6.1.4.2.4. Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio de pequenas modificações, individuais, nos seguintes parâmetros de trabalho: comprimento de onda, equipamento e fonte de água. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21- Avaliação da robustez do método analítico para análise de daptomicina por espectrofotometria na região do UV

Variável	Faixa investigada	Massa (g/frasco)	Teor (%)	DPR ¹ (%)
Comprimento de onda (nm)	219	0,514	102,89	0,56
	221 ²	0,519	103,74	
	223	0,513	102,63	
Equipamento	UV-Vis Shimadzu [®] , modelo UV-1800 ²	0,519	103,74	0,81
	UV-Vis Shimadzu [®] , modelo UV mini-1240	0,513	102,57	
Fonte de água	Osmose reversa ²	0,519	103,74	0,01
	Milli-Q	0,519	103,76	

¹ DPR = desvio padrão relativo

² Parâmetros normais de trabalho

6.1.4.2.5. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de espectrofotometria no UV, e os resultados estão descritos no item 5.4.4.2 e na Figura 10.

6.1.4.2.6. LD e LQ

Os limites de detecção e quantificação foram estimados para determinar a sensibilidade do método. O valor estimado para o limite de detecção foi de 0,14 µg/mL e para o limite de quantificação de 0,42 µg/mL.

6.1.5. Discussão

A espectrofotometria na região do UV é uma técnica muito utilizada, principalmente devido ao seu custo relativamente baixo, facilidade de manuseio e grande número de aplicações (ROCHA; TEIXEIRA, 2004). Baseia-se na absorção da energia eletromagnética por moléculas, a qual depende tanto da sua concentração quando da sua estrutura química (FB, 2010).

O desenvolvimento do método já foi discutido anteriormente, no item 5.4.5. A água foi definida como o solvente de escolha, pois além de apresentar características adequadas no

espectro por não absorver radiação UV na mesma região que a daptomicina, ainda possui baixo custo, é de fácil aquisição e descarte, não oferece riscos de contaminação aos operadores e não agride o meio ambiente. O fato de apresentar fácil descarte e não agredir o meio ambiente está de acordo com a tendência que algumas indústrias vêm seguindo há alguns anos, que é a de minimizar a sua geração de resíduos tóxicos e assim reduzir os impactos de suas atividades sobre o meio ambiente (SANSEVERINO, 2000).

A curva de Ringbom foi construída com o objetivo de se determinar a faixa de concentração ótima para o método espectrofotométrico. Assim, foram escolhidas concentrações de trabalho na faixa linear observada nesta curva (Figura 23), que foi de 6,0 a 21,0 µg/mL. Os resultados obtidos na avaliação da linearidade do método demonstraram que as soluções de daptomicina SQR apresentaram correlação linear entre as absorvâncias e concentrações no intervalo utilizado. Gráficos da concentração *versus* absorvância foram plotados e demonstraram haver linearidade adequada na faixa de 6,0 a 21,0 µg/mL. A equação da reta para o método foi: $y = 0,0299x + 0,0095$, com coeficiente de correlação (r) de 0,9999, o que mostra a adequada linearidade do método. É recomendado que o valor do coeficiente de correlação seja igual ou superior a 0,99 (BRASIL, 2003).

A análise estatística (Tabela 18) mostrou que o método apresentou regressão linear significativa, visto que o valor de F calculado (18820,25) foi superior ao de F tabelado (4,75) para este quesito. Além disso, a análise estatística mostrou que não houve desvio significativo da linearidade, já que o F calculado (0,33) foi menor que o F tabelado (3,26). Esta análise foi realizada a um nível de significância de 5%.

O método apresentou precisão adequada, visto que os valores de DPR% para os parâmetros intradia, interdias e entre-analistas foram 1,20%, 1,46% e 0,13%, respectivamente, os quais se encontram abaixo de 5,0%, que é o recomendado pela legislação brasileira (BRASIL, 2003). O método também mostrou exatidão apropriada, visto que apresentou valor experimental médio de recuperação de 99,94%, como mostra a Tabela 20.

A robustez foi avaliada por meio de pequenas modificações, individualmente, nos seguintes parâmetros do método: comprimento de onda, equipamento e fonte de água. Os valores calculados de DPR% se mostraram abaixo de 2,0%, conforme mostrado na Tabela 19, comprovando que é permitido haver pequenas modificações nestes parâmetros sem influenciar de maneira expressiva a análise do fármaco.

A avaliação da seletividade do método foi realizada em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento do método qualitativo de espectrofotometria no UV para a análise

da daptomicina, e foi discutida no item 5.4.5. A análise da solução aquosa do placebo, constituído apenas por NaOH, mostrou que esta substância não apresenta nenhuma banda de absorção que possa interferir na análise da daptomicina na forma farmacêutica (Figura 10). Este fato demonstra a seletividade do método.

O valor estimado para o limite de detecção foi de 0,14 µg/mL e para o limite de quantificação foi de 0,42 µg/mL. Estes valores sugerem a capacidade do método para detectar e quantificar com confiabilidade daptomicina em pó liofilizado para solução injetável.

O método proposto cumpre todos os requisitos preconizados pela literatura para validação de métodos analíticos (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014). Assim, ele é capaz de quantificar daptomicina em pó liofilizado para preparações injetáveis, apresentando as vantagens de ser um método de simples execução e utilizar solvente de baixo custo, fácil descarte, baixa toxicidade e ambientalmente favorável.

Este trabalho gerou um artigo científico: TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. A green approach for the determination of daptomycin in pharmaceutical formulation by UV spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 811-822, 2015.

6.2. Ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico

6.2.1. Considerações gerais

Para a análise de antimicrobianos, paralelamente aos métodos físico-químicos, também são recomendados métodos microbiológicos, os quais possibilitam a determinação da potência ou atividade de um produto contendo este tipo de fármaco. Isto é possível através da comparação da dose que inibe o crescimento de um micro-organismo suscetível em relação à dose de uma substância química de referência do antimicrobiano que produza inibição similar (FB, 2010).

Existem duas maneiras mais comuns de se determinar a potência de antimicrobianos: através do método de difusão em ágar e pelo método turbidimétrico. O primeiro se baseia na medida do diâmetro de zonas de inibição de crescimento microbiano formadas pela presença de uma substância antimicrobiana. O segundo se fundamenta na medida da diminuição da turbidez causada por inibição do crescimento de um cultivo microbiano em solução uniforme do antimicrobiano, em um meio líquido que favorece o seu rápido crescimento na ausência desse fármaco (ESMERINO et al., 2004; JP, 2011). Em ambos os casos, a resposta do micro-organismo tem relação direta com a concentração da substância ativa.

Estudos realizados com a daptomicina mostraram que seu mecanismo de ação é dependente de níveis fisiológicos de cálcio no organismo. Desta forma, para o desenvolvimento de um método microbiológico *in vitro*, é necessário suplementar o meio de cultura com este nutriente para obter atividade satisfatória do antimicrobiano em questão (FUCHS; BARRY; BROWN, 2000; KOETH; LECLERCQ; OLSSON-LILJEQUIST, 2004).

Na literatura, não foi encontrado nenhum trabalho que tenha realizado um método microbiológico para a avaliação da potência da daptomicina em pó liofilizado para solução injetável. Considerando que métodos microbiológicos fornecem informações importantes da atividade de antimicrobianos, as quais métodos físico-químicos não são capazes de fornecer, esta etapa do trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico para a análise da potência da daptomicina na forma farmacêutica.

6.2.2. Material

Para o desenvolvimento do método turbidimétrico foram utilizadas daptomicina SQR e daptomicina em pó liofilizado para solução injetável descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. Também foram utilizados o cloreto de cálcio diidratado (Synth, Diadema, Brasil) e o hidróxido de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

Durante os ensaios preliminares, as seguintes cepas foram utilizadas: *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 IAL 636, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 IAL 2082, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 IAL 1027.

O meio de cultura utilizado para os ensaios foi o caldo BHI (Merck, Darmstadt, Alemanha). Também foi empregado o meio de cultura ágar Casoy (Difco, Franklin Lakes, EUA) para a manutenção dos micro-organismos. Formaldeído grau analítico (Qhemis, São Paulo, Brasil) foi usado para interromper o crescimento dos micro-organismos.

Os meios de cultura foram esterilizados antes do uso em autoclave vertical modelo AV (Phoenix Luferco, São Paulo, Brasil). A incubação dos micro-organismos foi realizada em aparelho incubador *shaker* modelo MA420 (Marconi, Piracicaba, Brasil) e estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital (Odontobrás, Ribeirão Preto, Brasil). Para as leituras, utilizou-se espectrofotômetro modelo DU 530 (Beckman Coulter, Brea, EUA).

O *software Microsoft Excel* (2013) foi utilizado para a construção das curvas analíticas.

Também foram usados os seguintes equipamentos: micropipetador modelo 20-200 μL (Digipet, Curitiba, Brasil); balança analítica modelo H10 (Mettler Toledo, Barueri, Brasil) e balança semi-analítica modelo B160 (Micronal, São Paulo, Brasil).

6.2.3. Método

6.2.3.1. Ensaios preliminares para estabelecimento dos parâmetros analíticos

Para a padronização das melhores condições para o desenvolvimento do método turbidimétrico, foram realizados alguns ensaios preliminares, nos quais foram testados diferentes micro-organismos, soluções diluentes, concentrações de inóculo e de fármaco e concentração de cálcio no meio de cultura. A Tabela 22 apresenta todos os parâmetros testados.

Tabela 22- Parâmetros testados durante o desenvolvimento do ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico para análise da potência da daptomicina na forma farmacêutica

Parâmetros	Descrição
Micro-organismos	<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 IAL 1027
	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341 IAL 636
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 IAL 2082
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 IAL 2150
Meio de cultura	caldo Brain Heart Infusion (BHI)
Soluções diluentes	água purificada
	solução tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 8,0
Concentrações do inóculo (%)	4,0
	5,0
	6,0
	7,0
	0
Concentração de cálcio no meio de cultura (µg/mL)	50
	75
	80
	85
	100
	0
Concentrações das soluções padrão e amostra (µg/mL)	1,0; 2,0; 4,0
	2,0; 4,0; 8,0
	4,0; 8,0; 16,0
	8,0; 16,0; 32,0
	8,0; 12,0; 18,0
	10,0; 20,0; 40,0
	14,0; 28,0; 56,0
	16,0; 32,0; 64,0
	0

Após a realização dos ensaios preliminares, os parâmetros apresentados na Tabela 23 foram selecionados, por apresentarem melhor desempenho na análise.

Tabela 23- Parâmetros estabelecidos para a determinação da potência da daptomicina em pó para solução injetável pelo método turbidimétrico

Parâmetros	Descrição
Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 IAL 2082
Meio de cultura	caldo BHI
Diluyente	água
Concentração do inóculo	5,0 %
Concentração de cálcio no meio de cultura	75 µg/mL
Concentrações das soluções padrão e amostra	8,0; 12,0; 18,0 µg/mL

6.2.3.2. Preparo dos meios de cultura

Todos os meios de cultura foram preparados conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em água sob aquecimento e esterilizados em autoclave (condições: 121 °C, 1 atm) durante 15 minutos.

6.2.3.3. Preparo do inóculo

O micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 IAL 2082 foi inoculado com auxílio de alça de platina em 30 mL de caldo BHI e mantido, para o seu crescimento, em estufa microbiológica a temperatura de 35 °C ± 2 °C, durante as 24 horas anteriores à realização do experimento. Depois disso, o inóculo foi padronizado em espectrofotômetro a 580 nm, obtendo-se transmitância de 25% ± 2% (FB, 2010).

6.2.3.4. Preparo das soluções de daptomicina SQR

Para o preparo de uma solução estoque, o equivalente a 5,0 mg de daptomicina SRQ foi pesado e transferido analiticamente para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água purificada, resultando em solução de 100 µg/mL. Para balões volumétricos com capacidade de 5 mL foram transferidos volumes de 0,4; 0,6 e 0,9 mL desta solução estoque, cujos volumes foram completados com água purificada para obtenção de soluções de trabalho com as concentrações de 8,0; 12,0 e 18,0 µg/mL.

6.2.3.5. Preparo das soluções de daptomicina amostra

Foi preparada uma solução estoque de daptomicina amostra na concentração teórica de 100 µg/mL. Para isso, primeiramente foi verificado o peso médio de três frascos-ampola de daptomicina (descritos no item 4.3) e preparado um *pool* de amostras, conforme descrito no item 5.3.2.1.3.1. A partir deste *pool*, o equivalente a 5,0 mg de daptomicina foi analiticamente pesado e transferido para balão volumétrico de 50 mL. O volume do balão foi completado com água purificada para obtenção de solução estoque de 100 µg/mL.

Para balões volumétricos com capacidade de 5 mL foram transferidos volumes de 0,4; 0,6 e 0,9 mL desta solução estoque e os volumes foram completados com água purificada para obtenção de soluções de trabalho com as concentrações de 8,0; 12,0 e 18,0 µg/mL.

6.2.3.6. Preparo da solução de cálcio

Para obter uma solução contendo 10,0 mg/mL de cálcio a partir de cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), foram pesados 3,66 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (o equivalente a 1,0 g de cálcio) e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com água purificada e a solução foi devidamente homogeneizada.

6.2.3.7. Ensaio

O preparo do inóculo foi realizado como descrito no item 6.2.3.3. Depois disso, foram distribuídos em tubos de ensaio idênticos contendo 10 mL de caldo BHI estéril, 200 µL das soluções padrão ou amostra, descritas nos itens 6.2.3.4 e 6.2.3.5, respectivamente, e 75 µL da solução de 10,0 mg/mL de cálcio. Posteriormente foi adicionado 0,5 mL de caldo nutriente inoculado. Desta forma, foram utilizados 20 tubos de ensaio em retas paralelas 3 x 3, sendo três tubos para cada concentração do padrão e da amostra, um para o controle positivo (contendo caldo e o inóculo, sem adição de daptomicina) e um para o controle negativo (contendo somente o caldo). Para cada concentração do padrão e da amostra foram feitas três réplicas.

Os tubos foram incubados em banho de aquecimento com agitador orbital, a temperatura de $35,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 4 horas. Após o período de incubação, foi interrompida a multiplicação dos micro-organismos pela adição de 0,5 mL de solução de formaldeído 12% em cada tubo. O mesmo volume da solução de formaldeído também foi adicionado ao tubo do controle negativo. Em seguida, o aparelho foi zerado pelo tubo de ensaio contendo o controle

negativo e as leituras de absorvância em cada tubo foram efetuadas no comprimento de onda de 530 nm em espectrofotômetro.

Em cada ensaio, os resultados foram analisados estatisticamente e a potência foi calculada.

6.2.3.8. Obtenção da curva analítica

A curva analítica foi construída de acordo com o descrito no item 6.2.3.7, utilizando-se o delineamento 3x3, conforme o preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010). A reta foi construída em gráfico logarítmico da concentração *versus* a média das absorvâncias, com as médias das absorvâncias de cada uma das concentrações da SQR, com auxílio do *software Microsoft Excel* (2013). Foram realizadas três curvas, em três dias diferentes.

6.2.3.9. Cálculo da potência de daptomicina na forma farmacêutica

Para o cálculo da potência do da daptomicina no pó liofilizado, foi realizado o procedimento descrito no item 6.2.3.7. Depois disso, a potência foi calculada através da equação de Hewitt (HEWITT, 2004) (Equação 12).

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

$$M = F/b$$

$$b = E/I$$

Equação 12

Na qual:

$$F = 1/3[(\bar{A}_1 + \bar{A}_2 + \bar{A}_3) - (\bar{P}_1 + \bar{P}_2 + \bar{P}_3)]$$

$I = \logaritmo$ da razão das doses

$$E = 1/4[(\bar{A}_3 + \bar{P}_3) - (\bar{A}_1 + \bar{P}_1)]$$

6.2.3.10. Validação do método

O método foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, robustez e seletividade, de acordo com o preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014).

6.2.3.10.1. Linearidade

Para a análise da linearidade do método, foram avaliadas três curvas analíticas, realizadas em três dias diferentes. Cada curva foi construída de acordo com o descrito no item 6.2.3.8. Os resultados obtidos foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada por análise de variância (ANOVA).

6.2.3.10.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois quesitos: a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade (intradia) foi estudada pela realização da leitura de seis tubos diferentes, na mesma concentração de daptomicina SQR (12,0 µg/mL), mesmo dia e mesmas condições experimentais. O valor do desvio padrão relativo percentual (DPR%) entre as determinações foi analisado. A precisão intermediária (interdias e entre-analistas), por sua vez, foi avaliada através da realização de determinações da potência de daptomicina na amostra de pó liofilizado para solução injetável em três dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados (ICH, 2005).

6.2.3.10.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação. Neste ensaio, foi preparada uma solução estoque de daptomicina SQR na concentração de 200 µg/mL. Para isso, foi pesado o equivalente a 10,0 mg de daptomicina SRQ e transferido analiticamente para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água purificada. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 5 mL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água purificada, resultando em uma solução de 100 µg/mL. Alíquotas de 0,8; 1,2 e 1,8 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e os volumes foram completados com água purificada para obtenção de soluções com as concentrações de 8,0; 12,0 e 18,0 µg/mL, correspondentes a P1, P2 e P3, respectivamente.

Para o preparo das soluções para avaliação das recuperações, alíquota de 5 mL da solução estoque de daptomicina SQR 200 µg/mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL. Depois disso, foram adicionados 86 µL de uma solução de placebo previamente preparada (solução de NaOH a 1000 µg/mL) para simular a concentração de NaOH que teria

em uma solução de 100 µg/mL de amostra de daptomicina em pó liofilizado naquelas condições. O volume então foi completado com água purificada e resultou-se em uma solução de amostra simulada com 100 µg/mL de daptomicina SQR e 8,6 µg/mL de excipiente.

A partir desta solução de amostra simulada, alíquotas foram transferidas para balões de 10 mL para obter as soluções para avaliação das recuperações, de acordo com o descrito a seguir:

Para o teste de recuperação 1: foram transferidas alíquotas de 0,64; 0,96 e 1,44 mL da solução de amostra simulada de 100 µg/mL para balões volumétricos de 10 mL e os volumes foram completados com água purificada, obtendo-se soluções com as concentrações de 6,4 (R1); 9,6 (R2) e 14,4 (R3) µg/mL, representando amostra de 80% de potência.

Para o teste de recuperação 2: foram transferidas alíquotas de 0,8; 1,2 e 1,8 mL da solução de amostra simulada de 100 µg/mL para balões volumétricos de 10 mL e os volumes foram completados com água purificada, obtendo-se soluções com as concentrações de 8,0 (R1); 12,0 (R2) e 18,0 (R3) µg/mL, representando amostra de 100% de potência.

Para o teste de recuperação 3: foram transferidas alíquotas de 0,96; 1,44 e 2,16 mL da solução de amostra simulada de 100 µg/mL para balões volumétricos de 10 mL e os volumes foram completados com água purificada, obtendo-se soluções com as concentrações de 9,6 (R1); 14,4 (R2) e 21,6 (R3) µg/mL, representando amostra de 120% de potência.

Cada uma das amostras simuladas (R1, R2 e R3) foi doseada em ensaios independentes. A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada pela Equação 13.

$$R\% = \left(\frac{PR}{PT} \right) \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

Em que:

PR = potência encontrada nas amostras de recuperação

PT = potência teórica

6.2.3.10.4. Robustez

Para a avaliação da robustez do método, foram variados quatro parâmetros, individualmente: a concentração do inóculo (0,2% acima e abaixo da concentração de trabalho); a concentração de cálcio adicionada ao meio de cultura (5 µg/mL acima e abaixo); o comprimento de onda de leitura dos resultados (5 unidades de comprimento de onda acima e abaixo) e o tempo de incubação no *shaker* (10 minutos acima e abaixo). Para isso, foram realizadas determinações da potência de daptomicina na amostra de pó para solução injetável

nas diferentes condições propostas. As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao DPR% entre as determinações, comparando-as com as condições normais de trabalho.

6.2.3.10.5. Seletividade

Para avaliar a seletividade do método, primeiro foi preparada uma solução de placebo, constituída apenas por hidróxido de sódio, na mesma concentração que estaria em uma solução de 18 µg/mL de amostra de daptomicina em pó liofilizado. Para isso, foi pesada uma massa de 0,86 mg de hidróxido de sódio e transferida para balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão foi completado com água purificada, resultando em uma solução de 8,6 µg/mL de hidróxido de sódio. A partir desta solução, foi transferida uma alíquota de 1,8 mL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água purificada, obtendo-se uma solução de 1,56 µg/mL, mesma concentração de hidróxido de sódio que teria uma solução de 18 µg/mL de amostra de pó liofilizado de daptomicina.

Depois disso, em um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo BHI estéril foram adicionados 200 µL da solução de placebo e 0,5 mL do inóculo previamente padronizado como descrito no item 6.2.3.3. Em outro tubo contendo 10 mL de caldo BHI foi adicionado apenas 0,5 mL do inóculo previamente padronizado. O restante do procedimento foi igual ao descrito no item 6.2.3.7. Ao final do teste, o valor de absorvância fornecido pelo tubo contendo o placebo foi comparado com o valor de absorvância do tubo contendo apenas o meio de cultura com o inóculo para verificar se o hidróxido de sódio causou alguma inibição no crescimento microbiano. Este ensaio foi realizado em triplicata.

O mesmo procedimento foi realizado para avaliar se a solução de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ interfere no método proposto. Assim, no mesmo dia, em um outro tubo contendo 10 mL de caldo BHI estéril, foram adicionados 75 µL da solução de cloreto de cálcio descrita no item 6.2.3.6 e 0,5 mL de inóculo padronizado. O restante do procedimento foi igual ao descrito no item 6.2.3.7. Ao final do teste, o valor de absorvância fornecido pelo tubo contendo a solução de cloreto de cálcio foi comparado com o valor de absorvância do tubo contendo apenas o meio de cultura com o inóculo para verificar se o cloreto de cálcio causou alguma inibição no crescimento microbiano. Este ensaio também foi realizado em triplicata.

6.2.4. Resultados

6.2.4.1. Ensaios preliminares

Durante a realização dos ensaios preliminares para a padronização dos parâmetros para o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico (Tabela 22), primeiro foram testados os micro-organismos de baixa patogenicidade, *Kocuria rhizophila*, *Bacillus atrophaeus* e *Staphylococcus epidermidis*. No entanto, foi possível notar que a *Kocuria rhizophila* apresentou crescimento muito baixo no meio de cultura testado (caldo BHI) após 24 horas de incubação. Em relação aos micro-organismos *S. epidermidis* e *B. atrophaeus*, o primeiro demandou concentrações mais elevadas das soluções de daptomicina para que houvesse inibição do seu crescimento ($> 60 \mu\text{g/mL}$), e o segundo não se mostrou susceptível à daptomicina mesmo em concentrações altas ($> 60 \mu\text{g/mL}$). As duas cepas de *S. aureus* testadas apresentaram crescimento satisfatório no meio de cultura testado, além de resultados reprodutíveis e adequada linearidade.

Água e solução tampão fosfato pH 8,0 foram testadas como diluentes após os outros parâmetros do método serem selecionados. Ambas apresentaram resultados semelhantes.

Dentre as várias concentrações de inóculo testadas, a concentração de 5% apresentou os melhores resultados, devido ao crescimento em quantidade adequada do micro-organismo em relação às concentrações do antimicrobiano selecionadas. O mesmo ocorreu com as concentrações de daptomicina na faixa de 8,0 a 18,0 $\mu\text{g/mL}$, as quais mostraram melhor linearidade e precisão dos resultados.

Várias concentrações de cálcio no meio de cultura foram testadas e notou-se que a concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$ possibilitou uma maior atividade da daptomicina frente ao *S. aureus* em relação à concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Não houve diferença na inibição de crescimento bacteriano apresentada em concentrações acima de 75 $\mu\text{g/mL}$. O ensaio realizado sem a adição de cálcio ao meio de cultura mostrou que não houve inibição do micro-organismo-teste pelo antimicrobiano, reforçando a necessidade da adição desta substância ao meio de cultura.

6.2.4.2. Validação do método

6.2.4.2.1. Linearidade

Os valores de absorvância obtidos durante avaliação da linearidade do método, para as soluções em diferentes concentrações de daptomicina SQR e amostra, estão mostradas na Tabela 24.

Tabela 24- Valores de absorvância determinados para a construção da curva analítica de daptomicina pelo método turbidimétrico

µg/mL	Absorvância¹					
	P1 (8,0)	P2 (12,0)	P3 (18,0)	A1 (8,0)	A2 (12,0)	A3 (18,0)
Dia 1	0,724	0,464	0,193	0,721	0,455	0,169
Dia 2	0,735	0,448	0,192	0,753	0,445	0,153
Dia 3	0,763	0,442	0,184	0,796	0,461	0,157
Absorvância média	0,741	0,451	0,190	0,757	0,454	0,159
DPR²(%)	2,73	2,53	2,60	4,94	1,73	5,40

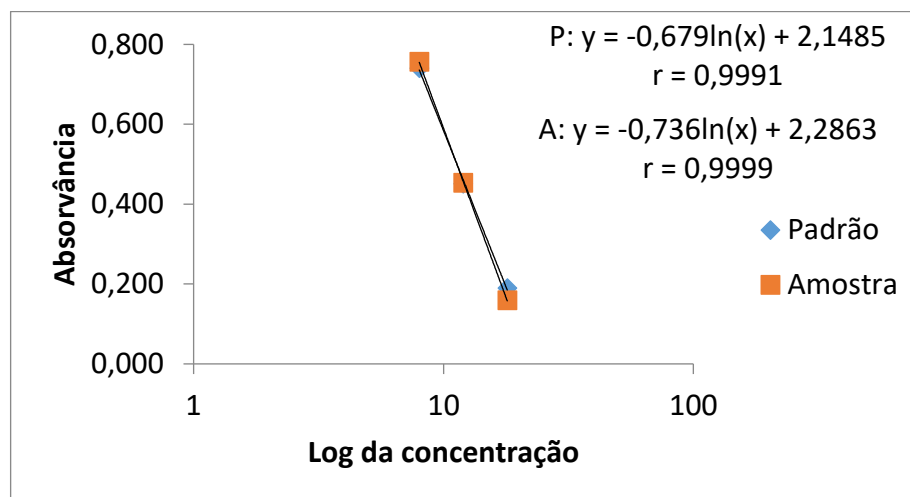
¹ Média de três determinações

² DPR: desvio padrão relativo

As curvas analíticas de daptomicina SQR e amostra (Figura 25) foram construídas com as médias dos valores das absorvâncias das três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo.

As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, foram: $y = -0,679\ln(x) + 2,1485$, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9991, para a daptomicina SQR e $y = -0,736\ln(x) + 2,2863$, com r de 0,9999, para o fármaco em pó para solução injetável.

Figura 25- Representação gráfica das curvas analíticas de soluções de daptomicina SQR e amostra, em concentrações de 8,0; 12,0 e 18,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico. P: daptomicina SQR. A: daptomicina amostra.



A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de daptomicina está apresentada na Tabela 25.

Tabela 25- Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de daptomicina, utilizando o método turbidimétrico

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F _{cal}	F _{tab}
Preparação	1	0,00007	0,00007	0,20	4,96
Regressão	1	0,98852	0,98852	2777,84*	4,96
Paralelismo	1	0,00161	0,00161	4,51	4,96
Quadrático	1	0,00034	0,00034	0,96	4,96
Diferença de quadrático	1	0,00009	0,00009	0,26	4,96
Entre doses	5	0,9906	0,1981	556,75*	3,33
Entre tubos	2	0,0006	0,0003	0,89	4,10
Dentro (erro)	10	0,0036	0,0004		
Total	17	0,9948			

*Significativo para $p < 0,05$

6.2.4.2.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em três parâmetros: intradia, interdias e entre-analistas. Os resultados foram expressos com base nos valores de DPR%. A precisão intradia (repetibilidade), na qual a concentração de 12,0 µg/mL de daptomicina SQR foi repetida por seis vezes, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceu valor

percentual de DPR de 4,32%. Os valores percentuais de DPR apresentados pelos parâmetros interdias e entre-analistas estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26- Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método turbidimétrico para análise de daptomicina em pó liofilizado

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre-analistas		
		Massa ¹ (g/frasco)	Potência ¹ (%)	DPR ² (%)		Massa ¹ (g/frasco)	Potência ¹ (%)	DPR ² (%)
1	1	0,509	101,78	1,48	1	0,509	101,78	4,08
	2	0,506	101,17					
	3	0,495	98,94		2	0,539	107,82	

¹ média de três determinações

² DPR = desvio padrão relativo

6.2.4.2.2. Exatidão

Determinou-se a exatidão do método pelo teste de recuperação. Utilizando a Equação 13, obteve-se valor médio de exatidão de 101,41%. Os resultados do teste de recuperação estão representados na Tabela 27.

Tabela 27- Teores obtidos no teste de recuperação do método turbidimétrico para determinação da potência de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável

	Potência teórica (%)	Potência encontrada ¹ (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR ² (%)
Recuperação 1	80,00	81,35	101,69	101,41	0,25
Recuperação 2	100,00	101,19	101,19		
Recuperação 3	120,00	121,62	101,35		

¹ média de três determinações

² DPR = desvio padrão relativo

6.2.4.2.3. Robustez

A robustez foi avaliada, modificando-se quatro parâmetros, individualmente: a concentração do inóculo, a concentração de cálcio adicionada ao meio de cultura, o comprimento de onda de leitura dos resultados e o tempo de incubação no *shaker*. Os valores de DPR% entre os doseamentos calculados para todos os parâmetros testados ficaram abaixo de 5%.

A Tabela 28 apresenta os resultados obtidos durante a avaliação da robustez pelo método proposto.

Tabela 28- Valores obtidos na avaliação da robustez do método turbidimétrico para análise da potência de daptomicina em pó para solução injetável

Variável	Faixa investigada	Daptomicina (g/frasco)	Daptomicina (%)	DPR ¹ (%)
Concentração do inóculo (%)	4,8	0,459	91,70	4,22
	5,0	0,495	98,94	
	5,2	0,462	92,45	
Concentração de cálcio (µg/mL)	70	0,519	103,87	2,39
	75	0,506	101,17	
	80	0,496	99,11	
Comprimento de onda para leitura (nm)	525	0,494	98,79	1,57
	530	0,506	101,17	
	535	0,491	98,22	
Tempo de incubação no shaker	3h50min	0,484	96,87	3,53
	4h	0,506	101,17	
	4h10min	0,520	103,92	

¹DPR: desvio padrão relativo

6.2.4.2.4. Seletividade

A seletividade do método foi testada para avaliar se o excipiente presente na amostra de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável interfere nas análises do método desenvolvido. Para isso, foi verificado se o NaOH, único adjuvante da forma farmacêutica, apresentaria atividade antimicrobiana sobre o micro-organismo-teste. Da mesma forma, foi verificado se o CaCl₂.2H₂O, com o qual se preparou a solução de cálcio adicionada ao meio de cultura e necessária para a atividade antimicrobiana da daptomicina, interferia nas análises. As absorvâncias obtidas nos ensaios foram comparadas com as obtidas com um controle positivo, ou seja, contendo apenas meio de cultura e o inóculo.

A Tabela 29 apresenta os resultados obtidos na análise da seletividade do método e mostra que em nenhum dos casos houve interferência dos compostos testados.

Tabela 29- Valores de absorvância obtidos na análise da seletividade do método turbidimétrico para análise da potência de daptomicina em pó para solução injetável

	Absorvâncias obtidas com o controle positivo	Absorvâncias obtidas no ensaio com o NaOH	Absorvâncias obtidas no ensaio com o CaCl ₂ .2H ₂ O
1	0,862	0,830	0,894
2	0,913	0,897	0,976
3	0,852	0,932	0,947
Média	0,876	0,886	0,939

6.2.5. Discussão

Métodos microbiológicos têm como objetivo determinar a potência do antimicrobiano com base em sua atividade antimicrobiana (JP, 2010). Entre os métodos microbiológicos mais utilizados, destacam-se o método por difusão em ágar e o turbidimétrico.

Para o desenvolvimento deste trabalho, o método escolhido foi o turbidimétrico, principalmente devido às vantagens que ele oferece em relação ao difusão em ágar. Primeiro, trata-se de um método mais rápido, o qual fornece os resultados após apenas 4 horas de análise, enquanto o método por difusão em ágar necessita tempo maior de incubação, de 24 horas, em média (TÓTOLI; SALGADO, 2013). Esta vantagem torna-o mais conveniente para as análises rotineiras de controle de qualidade. Além disso, o método por difusão em ágar apresenta outra limitação, que é o fato de alguns fármacos exibirem dificuldade de se difundirem através do meio de cultura sólido, o que não ocorre no método turbidimétrico por empregar um meio de cultura líquido. Ao mesmo tempo, a leitura dos resultados, neste caso, é realizada com auxílio de um equipamento (espectrofotômetro), o que minimiza a ocorrência de erros em relação ao método de difusão em ágar, no qual as medidas dos halos de inibição são realizadas através da percepção do analista.

Os métodos microbiológicos, de maneira geral, apresentam desvantagens quanto ao tempo de execução e o volume de trabalho e material empregados. Por tais motivos, frequentemente estes métodos vêm sendo substituídos por métodos físico-químicos nas análises de rotina do controle de qualidade de antimicrobianos. No entanto, esta não é uma prática recomendável, visto que os métodos microbiológicos fornecem informações sobre a atividade biológica destes fármacos as quais métodos físico-químicos não são capazes de fornecer. Muitas vezes a parte da molécula essencial para atividade antimicrobiana pode não ser a mesma detectada no método físico-químico, gerando conclusões falsas sobre qualidade do medicamento (MORENO; SALGADO, 2007; SILVA, 2012). Desta forma, os ensaios

microbiológicos para a determinação da potência de antimicrobianos ainda desempenham um papel essencial nos processos de fabricação e de controle de qualidade destes fármacos.

Durante o desenvolvimento do método, foram testadas concentrações de antimicrobiano que variaram entre 1,0 e 64,0 µg/mL. Diante disso, foram escolhidas as concentrações de 8,0; 12,0 e 18,0 µg/mL por terem apresentado a melhor correlação entre a dose e a resposta da substância em análise. O mesmo motivo levou à escolha da concentração de 5% de inóculo. Da mesma forma, foi realizada a escolha do micro-organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 IAL 2082, já que, dentre as bactérias analisadas, foi a que apresentou melhor resposta frente à daptomicina.

As soluções diluentes testadas, água e solução tampão pH 8,0, apresentaram resultados parecidos. Desta forma, optou-se pelo uso da água devido à praticidade de seu uso e economia do material necessário para o preparo de soluções tampão. Com relação à concentração de cálcio no meio de cultura, várias concentrações foram testadas e optou-se pelo uso de 75 µg/mL por apresentar um melhor resultado em relação às outras concentrações testadas. Foi possível notar que sem a adição de cálcio ao meio de cultura, a daptomicina não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus* e este fato vem ao encontro das informações encontradas na literatura, as quais mostram que o mecanismo de ação de ação da daptomicina é completamente dependente da presença deste nutriente (JUNG et al., 2004; HANCOCK, 2005; BAMBEKE et al., 2008).

O método foi validado de acordo com o preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014). A linearidade foi comprovada avaliando-se os coeficientes de correlação (r) de 0,9991 e 0,9999, para SQR e amostra, respectivamente, valores excelentes para um ensaio biológico. A linearidade do método também foi demonstrada por meio de análise estatística (Tabela 25), a qual demonstrou que não existe desvio da linearidade nas curvas analíticas provenientes da substância química de referência e amostra. Esta conclusão é baseada no fato de que o parâmetro “quadrático” apresentou F calculado (0,96) menor que F tabelado (4,96), assim como ocorreu com a “diferença de quadrático”, na qual F calculado (0,26) também apresentou valor inferior ao de F tabelado (4,96).

Também foi evidenciado, estatisticamente, que não existe diferença significativa na inclinação das curvas analíticas da substância química de referência e da amostra, já que o parâmetro “paralelismo” apresentou F calculado (4,51) menor que F tabelado (4,96). Esta análise foi realizada a um nível de significância de 5%.

A precisão do método foi avaliada em três quesitos: intradia, interdias e entre-analistas. Os parâmetros interdias e entre-analistas foram realizados pela comparação das potências obtidas em diferentes dias, no caso da precisão interdias, e através de diferentes analistas, para a entre-analistas. A precisão intradia foi realizada pela leitura de seis tubos diferentes, na mesma concentração e mesmas condições experimentais. O valor de DPR% obtido na precisão interdias foi de 1,48%, na entre-analistas foi 4,08% e intradia, 4,32%. Estes valores se encontram abaixo do valor estabelecido pela RE nº 899, de 15%, para métodos bioanalíticos (BRASIL, 2003).

A exatidão do método foi comprovada pelo teste de recuperação. Neste teste, quantidade conhecida de SQR foi adicionada à solução contendo o excipiente do medicamento (placebo contaminado). A recuperação média estimada foi de 101,41%, dado que demonstra a capacidade do método de determinar teores pré-definidos de modo exato.

A robustez do método foi realizada variando-se, individualmente, a concentração do inóculo, a concentração de cálcio adicionada ao meio de cultura, o comprimento de onda de leitura dos resultados e o tempo de incubação no *shaker*. O método se mostrou robusto para todos os parâmetros testados.

Quanto à seletividade do método, foi verificado que o excipiente da amostra de daptomicina em pó liofilizado, o NaOH, não interfere na análise. Para isso, esta substância foi submetida à análise frente ao micro-organismo-teste sem a presença do antimicrobiano, e os resultados obtidos foram comparados ao do controle positivo. Assim, foi possível notar que o NaOH não apresenta qualquer atividade antimicrobiana, portanto os resultados obtidos nos ensaios são exclusivamente provenientes da daptomicina. O cloreto de cálcio, quando submetido ao mesmo teste, também mostrou que não possui nenhuma atividade antimicrobiana.

Assim sendo, o método proposto mostrou-se linear, preciso, exato, robusto e seletivo, atendendo a todas as exigências para uma adequada quantificação de daptomicina em pó para solução injetável, podendo ser utilizado em análises de rotina do controle de qualidade. Além disso, fornece resultados em apenas 4 horas, tempo comparável ao de métodos físico-químicos.

Este trabalho gerou um artigo científico, publicado em revista internacional: TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Rapid turbidimetric assay to determine the potency of daptomycin in lyophilized powder. **Pharmaceutics**, v. 7, p. 106-121, 2015.

6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) indicativa de estabilidade

6.3.1. Considerações gerais

A CLAE é uma das técnicas mais utilizadas para a análise quantitativa de fármacos na indústria farmacêutica. Entre suas vantagens, destacam-se a possibilidade de se realizar análises em um curto intervalo de tempo, a capacidade de analisar misturas complexas devido à sua alta resolução, suas análises quantitativas são de fácil execução e grande precisão, apresenta boa sensibilidade, é extremamente versátil por possibilitar a análise de substâncias orgânicas e inorgânicas, líquidas ou sólidas, iônicas ou covalentes e ainda permite a automatização de suas análises, trazendo praticidade a análises de rotina. Por outro lado, uma das suas principais desvantagens é o alto custo da instrumentação e operação, já que esta técnica demanda solventes orgânicos de alta pureza e custo, além de colunas analíticas dispendiosas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

Para ser indicativo de estabilidade, um método deve ter a capacidade de quantificar o ingrediente ativo sem a interferência de produtos de degradação, impurezas de processo, excipientes ou outras impurezas em potencial (ALSANTE et al., 2007).

Na literatura são encontrados alguns trabalhos que descrevem o desenvolvimento de métodos de CLAE para a análise da daptomicina, sendo a maior parte deles voltada para fluidos biológicos, como pode ser visto na Tabela 2, encontrada na seção de revisão bibliográfica de métodos analíticos para a análise da daptomicina deste trabalho.

Há apenas dois trabalhos na literatura, recentemente publicados, em que foram desenvolvidos métodos analíticos para análise da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável, por CLAE (CHRIST et al., 2014; GONG et al., 2014). No entanto, Christ e colaboradores (2014) optaram por fase móvel constituída por uma mistura de solventes orgânicos potencialmente tóxicos (metanol e acetonitrila) e solução tampão, a qual pode precipitar e causar problemas de entupimento em colunas analíticas e em todo o sistema cromatográfico. Além disso, o pH da fase móvel foi ajustado para um nível extremamente ácido (2,2), o que também pode contribuir para reduzir a vida útil do sistema cromatográfico. Gong e colaboradores (2014) também optaram por fase móvel constituída por acetonitrila.

Por tais motivos, foi desenvolvido um novo método analítico para quantificação da daptomicina em pó para solução injetável por CLAE, utilizando como fase móvel apenas uma mistura de etanol e água com pH ajustado para 4,5, visando tornar o método mais simples,

mais seguro para o operador e ainda minimizar os problemas que a presença de soluções-tampão na constituição de fases móveis poderia causar no sistema cromatográfico.

6.3.2. Material

Para a análise cromatográfica foram utilizadas daptomicina SQR e daptomicina em pó liofilizado para preparações injetáveis descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente.

As fases móveis utilizadas neste trabalho foram preparadas a partir de água ultrapurificada obtida através de equipamento Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, EUA). O etanol utilizado na preparação da fase móvel possui grau HPLC e foi adquirido da J.T. Baker (Ecatepec de Morelos, México). A solução de ácido acético utilizada para ajustar o pH das fases móveis foi adquirida da J.T. Baker (Ecatepec de Morelos, México). A fase móvel, após preparada, foi submetida à degaseificação em banho ultrassônico modelo USC2800A (Unique, Indaiatuba, Brasil), por 30 minutos. Todas as soluções foram filtradas através de membrana de 0,45 µm (Pall Corporation, Michigan, EUA) antes de serem injetadas.

Para os estudos de degradação forçada, foram utilizados os seguintes materiais: HCl (Qhemis, São Paulo, Brasil), NaOH (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), solução de H₂O₂ 0,3% (Impex, Varginha, Brasil) e câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm) com lâmpada UVC (254 nm) 20 W.

O equipamento de CLAE usado foi Waters, modelo 1525 (Waters Chromatography Systems, Milford, EUA), conectado a detector de UV/Visível Waters 2487 e injetor manual 7725i com *loop* de 20 µL (Rheodyne Breeze, Berkeley, EUA). A separação cromatográfica foi realizada através de condições isocráticas de fase reversa em coluna Agilent Zorbax C₁₈, 5 µm, 4,6 x 150 mm (Agilent, Santa Clara, EUA).

Também foi usado cromatógrafo Shimadzu® (Kyoto, Japão) modelo Auto Injector SIL-10A, acoplado a detector por arranjo de diodos (DAD) Shimadzu® modelo SPD-M10A, para a análise da pureza dos picos obtidos no ensaio de seletividade e estudos de degradação forçada do método desenvolvido. O *software* utilizado neste caso foi o LC Solution®. Estas análises foram realizadas no Laboratório NUBB 2, localizado no Instituto de Química da UNESP, em Araraquara.

O *software* Microsoft Excel (2013) foi utilizado para a construção da curva analítica.

Os seguintes equipamentos também foram utilizados: banho-maria modelo Q334M (Quimis, Diadema, Brasil); balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo, Barueri, Brasil);

micropipetador modelo 20-200 μL (Digipet, Curitiba, Brasil); câmara UV com espelhos em seu interior, equipada com lâmpada UVC (254 nm).

6.3.3. Método

6.3.3.1. Ensaios preliminares

Os ensaios preliminares para definição das melhores condições cromatográficas foram realizados durante o desenvolvimento de método de CLAE para a análise qualitativa da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado. Estas informações estão disponíveis no item 5.5 deste trabalho. As condições cromatográficas escolhidas foram descritas na Tabela 7, presente no item 5.3.3.4.

6.3.3.2. Obtenção da curva analítica

Para a realização da curva analítica, foram pesados analiticamente o equivalente a 5,0 mg de daptomicina SQR, depois transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com fase móvel, para obtenção de solução estoque com concentração teórica de 100 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL, e os volumes foram completados com fase móvel, para obtenção das soluções de trabalho com as concentrações de 20, 30, 40, 50, 60 e 70 $\mu\text{g/mL}$ de daptomicina SQR. Cada concentração foi preparada em triplicata e submetida à filtração antes das injeções. A curva analítica foi construída, com auxílio do *software Microsoft Excel* (2013), através da disposição das concentrações das soluções de trabalho de daptomicina SQR em relação às respectivas médias das áreas dos picos obtidas para cada uma delas. Este procedimento foi realizado três dias diferentes e uma curva analítica final com a média dos três dias foi construída.

6.3.3.3. Determinação de daptomicina na amostra de pó liofilizado para solução injetável

6.3.3.3.1. Preparo da solução de daptomicina SQR

Foi preparada uma solução estoque de daptomicina SQR na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, como descrito no item 6.3.3.2. Foram transferidos volumes de 2,0 mL desta solução estoque para balões volumétricos com capacidade de 5 mL e os volumes foram

completados com fase móvel para obtenção de soluções de trabalho com a concentração de 40,0 µg/mL. O preparo das soluções foi realizado em triplicata e estas foram submetidas à filtração antes das injeções.

6.3.3.3.2. Preparo da solução de daptomicina amostra

Foi preparada uma solução estoque de daptomicina amostra na concentração teórica de 100 µg/mL. Para isso, primeiramente foi verificado o peso médio de três frascos-ampola de daptomicina (descritos no item 4.3) e preparado um *pool* de amostras, conforme descrito no item 5.3.2.1.3.1. A partir deste *pool*, o equivalente a 5,0 mg de daptomicina foi analiticamente pesado e transferido para balão volumétrico de 50 mL. O volume do balão volumétrico foi completado com fase móvel para obtenção de solução estoque de 100 µg/mL.

Foram transferidos volumes de 2,0 mL desta solução estoque para balões volumétricos com capacidade de 5 mL cujos volumes foram completados com fase móvel para obtenção de soluções de trabalho com a concentração teórica de 40,0 µg/mL. O preparo das soluções foi realizado em triplicata e estas foram submetidas à filtração antes das injeções.

6.3.3.3.3. Cálculo do teor de daptomicina na amostra

A concentração de daptomicina na amostra foi calculada pela Equação 7 e o seu teor percentual foi calculado pela Equação 8. Estas equações foram descritas anteriormente no item 6.1.3.3.3 deste trabalho.

6.3.3.4. Validação do método

O método foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade, limites de detecção e quantificação e conformidade do sistema cromatográfico, de acordo com o preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014).

6.3.3.4.1. Linearidade

Para a análise da linearidade do método, foram avaliadas três curvas analíticas, realizadas em três dias diferentes. Cada curva foi construída de acordo com o descrito no item 6.3.3.2. Os resultados obtidos foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método

dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada por análise de variância (ANOVA).

6.3.3.4.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois quesitos: a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade (intradia) foi estudada através da análise de seis soluções de daptomicina SQR na concentração de 40,0 µg/mL, no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. O valor do desvio padrão relativo percentual (DPR%) entre as determinações foi avaliado. A precisão intermediária (interdias e entre-analistas), por sua vez, foi avaliada através da realização de determinações do teor de daptomicina na amostra de pó para solução injetável em três dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados (ICH, 2005).

6.3.3.4.3. Exatidão

A exatidão do método foi realizada através do ensaio de recuperação, no qual quantidades conhecidas de daptomicina SQR foram adicionadas a quantidades conhecidas de amostra (ICH, 2005). A recuperação foi realizada em três níveis, R1, R2 e R3, e as soluções foram preparadas segundo a Tabela 30, em triplicata.

Tabela 30- Preparo das soluções para o teste de recuperação do método cromatográfico para daptomicina

	Daptomicina amostra (100 µg/mL) (mL)	Daptomicina SQR (100 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL) ^{1,2}
Amostra	1,0	-	20,0
R1	1,0	0,6	32,0
R2	1,0	1,0	40,0
R3	1,0	1,4	48,0
Padrão	-	1,0	20,0

¹ Balão volumétrico de 5 mL

² Cada nível de concentração foi preparado em triplicata

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada através da Equação 9, determinada pela AOAC (AOAC, 2002) e descrita na seção 6.1.3.4.3 deste trabalho.

6.3.3.4.4. Robustez

Para a avaliação da robustez do método, foi utilizado o modelo fatorial de Plackett-Burman, baseado em uma matriz de 15 experimentos, variando-se 7 parâmetros em níveis superiores e inferiores em relação aos de trabalho. A Tabela 31 apresenta a combinação fatorial proposta por este modelo, em que as letras de A a G representam os fatores (parâmetros de trabalho escolhidos para serem variados) e os números de 1 a 15 representam o número de experimentos ($2n + 1$), sendo que n é o número de fatores. O número zero corresponde aos parâmetros normais que foram previamente estabelecidos durante a validação do método, enquanto os números 1 e -1 correspondem aos níveis superiores e inferiores que foram variados em relação aos parâmetros normais (BERZAS et al., 2004).

Tabela 31- Combinação fatorial proposta pelo modelo Plackett-Burman

Parâmetro	Combinação Fatorial														
Analítico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1	0	0
B	0	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1	0
C	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1
D	1	0	0	1	1	1	0	0	-1	0	0	-1	-1	-1	0
E	0	1	0	0	1	1	1	0	0	-1	0	0	-1	-1	-1
F	1	0	1	0	0	1	1	0	-1	0	-1	0	0	-1	-1
G	1	1	0	1	0	0	1	0	-1	-1	0	-1	0	0	-1
Resultados	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o

A a G: fatores selecionados

1-15: número de experimentos ($2n + 1$), em que n = número de fatores

0: fator sem variação

1: fator variado para nível superior

-1: fator variado para nível inferior

Os parâmetros de trabalho (fatores) e os níveis selecionados para o ensaio realizado estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32- Fatores e níveis de variação selecionados para avaliação da robustez do método cromatográfico para análise de daptomicina

	Fator	Unidade	Condição variada (-1)	Condição normal (0)	Condição variada (+1)
A	Temperatura da sala	°C	23	25	27
B	Vazão da fase móvel	mL/min	0,58	0,60	0,62
C	Marca do etanol	-	Tedia	J. T. Baker	Panreac
D	Proporção da fase móvel (água:etanol)	%	47:53 v/v	45:55 v/v	43:57 v/v
E	Fonte de água	-	Laboratório 1	Laboratório 2	Laboratório 3
F	Comprimento de onda	nm	219	221	223
G	pH da fase móvel	-	4,3	4,5	4,7

0: fator sem variação

1: fator variado para nível superior

-1: fator variado para nível inferior

Para cada experimento, de 1 a 15, em que diferentes fatores e níveis de variação foram aplicados, foi realizado um doseamento da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado, de acordo com o método descrito no item 6.3.3.3. A influência das variações de cada fator no resultado final é baseada em uma análise do fator em condições normais em relação a ele variado em níveis superior e inferior.

A análise do fator “temperatura da sala” (A) será dado como exemplo. Para sua avaliação, primeiro foram analisados os experimentos de 1 a 8 da Tabela 31, onde foram comparados os doseamentos obtidos em condições normais de temperatura (0) com os doseamentos obtidos com a temperatura variada para nível superior (1). Desta forma, a média de quatro doseamentos correspondentes ao número 0 (condições normais) foi comparada à média de quatro outros doseamentos correspondentes ao número 1 (condições alteradas para nível superior). A Equação 14 exemplifica a avaliação do efeito da mudança da temperatura para nível superior.

$$DA = \frac{d + f + g + h}{4} - \frac{a + b + c + e}{4}$$

Equação 14

Em que:

$d + f + g + h$ = teores das amostras determinados com a temperatura da sala normal (25 °C)

$a + b + c + e$ = teores das amostras determinados com a temperatura da sala mais elevada (27 °C)

Depois disso, mesmo procedimento é realizado, agora com os experimentos de 8 a 12 da Tabela 31, onde foram comparados os doseamentos obtidos em condições normais de temperatura (0) com os doseamentos obtidos com a temperatura variada para nível inferior (-1), de acordo com a equação 15.

$$DA' = \frac{h + l + n + o}{4} - \frac{i + j + k + m}{4} \quad \text{Equação 15}$$

Em que:

$h + l + n + o$ = teores das amostras determinados com a temperatura da sala normal (25 °C)

$i + j + k + m$ = teores das amostras determinados com a temperatura da sala menor (23 °C)

A interpretação do teste foi realizada pela comparação do valor obtido nas equações 14 e 15 com o valor resultante da Equação 16 (BERZAS et al., 2004).

$$\text{Valor de referência} = \sqrt{2S} \quad \text{Equação 16}$$

Em que:

$$S = \sqrt{\frac{2}{7} (DA + DB + DC + DE + DF + DG)}$$

Obs: os valores de DA a DG devem ser substituídos pelos valores de DA' a DG' para a análise dos níveis inferiores de variação para este fator.

Os valores encontrados nas Equações 14 e 15 (em módulo) devem ser menores que o valor determinado na Equação 16 para que estes efeitos sejam interpretados como não significantes.

6.3.3.4.5. Seletividade e estudo de degradação forçada

A seletividade do método de CLAE foi demonstrada de duas maneiras: na primeira, mostrando que o excipiente presente na forma farmacêutica de pó liofilizado não interfere na análise da daptomicina; na segunda, submetendo a amostra de daptomicina a condições forçadas de estresse e demonstrando que os produtos de degradação formados também não interferem com a análise do fármaco.

6.3.3.4.5.1. Análise da interferência do excipiente

A seletividade do método quanto à interferência do excipiente foi avaliada em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de CLAE e o método foi descrito no item 5.3.2.2.2.

6.3.3.4.5.2. Estudo de degradação forçada

Soluções de amostra de daptomicina (40 µg/mL) foram submetidas à degradação forçada por condições ácida, alcalina, aquosa, oxidativa e fotolítica, com os objetivos de avaliar se o sistema cromatográfico escolhido é capaz de detectar a degradação da daptomicina na forma farmacêutica de pó para solução injetável, revelar a presença de possíveis produtos de degradação e demonstrar que estes produtos não interferem na análise da daptomicina, demonstrando a seletividade do método.

A solução amostra foi preparada em HCl 0,01 M e NaOH 0,001 M para as hidrólises ácida e alcalina, respectivamente. As amostras foram aquecidas a 60 °C. A degradação aquosa foi realizada pela exposição de solução aquosa da amostra à temperatura de 60 °C, em banho-maria. Para a degradação oxidativa, a solução amostra foi preparada em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% (p/v) e depois foi submetida à temperatura de 60 °C. A fotodegradação foi induzida através da exposição de uma solução aquosa da amostra à luz ultravioleta, utilizando câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC (254 nm) 20 W.

Para se calcular a porcentagem de degradação, foram comparadas as áreas dos picos obtidos com a daptomicina íntegra e após as degradações. Os tempos de análise foram 0; 0,25; 0,50; 1,5; 3; 6; 24 e 48 horas. No caso da degradação fotolítica, foram necessários 7 dias de análise para se obter uma degradação satisfatória, já que o ideal é que em estudos de

degradação forçada para a validação de métodos indicativos de estabilidade se obtenha uma degradação entre 5 e 20% (BLESSY et al., 2013).

Após todas as condições forçadas de degradação, foi realizada uma análise da pureza dos picos da daptomicina para verificar se houve a interferência de algum produto de degradação na análise do fármaco. Para isso, foi utilizado um equipamento de CLAE acoplado a detector por arranjo de diodos.

6.3.3.4.6. LD e LQ

Os limites de detecção e quantificação foram estimados pelas Equações 10 e 11, respectivamente, descritas no item 6.1.3.4.6, com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva (ICH, 2005).

6.3.3.4.7. Teste de conformidade do sistema cromatográfico

O teste de conformidade do sistema cromatográfico foi realizado em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de CLAE e o método foi descrito no item 5.3.2.1.1.

6.3.4. Resultados

6.3.4.1. Ensaios preliminares

Os ensaios preliminares foram realizados em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de CLAE e os resultados estão descritos na seção 5.5.4.1.

6.3.4.2. Validação do método

6.3.4.2.1. Linearidade

Os valores das áreas obtidas para a curva analítica de daptomicina SQR estão apresentados na Tabela 33.

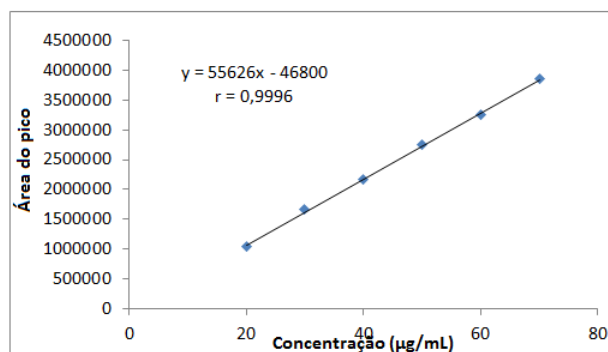
Tabela 33- Valores das áreas referentes ao pico de daptomicina SRQ para a construção da curva analítica de CLAE

Concentração (µg/mL)	Áreas ¹ (AU)	Área média ± DP ²	DPR ³ (%)
20,0	1032922	1040994 ± 8118,391	0,78
	1049158		
	1040902		
30,0	1696795	1660541 ± 31415,75	1,89
	1643520		
	1641310		
40,0	2165874	2171997 ± 46659,39	2,15
	2128701		
	2221415		
50,0	2711028	2746803 ± 39034,69	1,42
	2788435		
	2740945		
60,0	3213156	3254486 ± 35816,11	1,10
	3276444		
	3273857		
70,0	3829848	3863516 ± 45718,34	1,18
	3845135		
	3915564		

¹ Valor médio de três determinações² DP: desvio padrão³ DPR: desvio padrão relativo

Cada valor médio das áreas absolutas obtidas na determinação da curva analítica foi disposto em um gráfico em relação à sua respectiva concentração, conforme ilustrado na Figura 26.

Figura 26- Curva analítica de daptomicina SQR obtida pelo método de CLAE desenvolvido. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm).



A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de daptomicina SQR está apresentada na Tabela 34.

Tabela 34- Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de daptomicina SQR, utilizando o método de CLAE

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	16256697345319,60	3251339469063,92	2400,51*	3,11
Regressão linear	1	16256697345319,60	16256697345319,60	12002,55*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,00	0,00	0,00	3,26
Resíduo	12	16253247301,72	1354437275,14		
Total	17	16272950592621,30	-		

*Significativo para $p < 0,05$

6.3.4.2.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em três parâmetros: intradia, interdias e entre-analistas. Os resultados foram expressos com base nos valores de DPR percentuais. A precisão intradia forneceu um valor de DPR de 1,85%. Os valores percentuais de DPR apresentados pelos parâmetros interdias e entre-analistas estão apresentados na Tabela 35.

Tabela 35- Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método para a análise da daptomicina por CLAE

Interdias					Entre-analistas			
Amostra	Dia	Massa ¹ (g/frasco)	Teor ¹ (%)	DPR ² (%)	Analista	Massa ¹ (g/frasco)	Teor ¹ (%)	DPR ² (%)
1	1	0,499	99,88	1,44	1	0,499	99,88	1,42
	2	0,510	101,90					
	3	0,496	99,10					

¹ média de três determinações² DPR = desvio padrão relativo**6.3.4.2.3. Exatidão**

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, o qual foi realizado em três níveis de concentração e os resultados estão apresentados na Tabela 36.

Tabela 36- Determinação da exatidão do método analítico para análise de daptomicina por CLAE

	Daptomicina SQR adicionada (µg/mL)	Daptomicina SQR encontrada ¹ (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR ² (%)	Recuperação média (%)
R1	12,0	11,97	99,72	0,44	99,98
R2	20,0	19,83	99,13	0,96	
R3	28,0	28,31	101,09	0,75	

¹ média de três determinações² DPR = desvio padrão relativo (dentro de cada nível de recuperação)**6.3.4.2.4. Robustez**

Na avaliação da robustez pelo modelo Plackett-Burman, foram aplicadas as Equações 14, 15 e 16 para avaliação da significância dos efeitos. Os resultados obtidos nos ensaios estão apresentados na Tabela 37. Os valores de referência obtidos pela Equação 16 foram 1,43 e 1,54, para níveis superiores e inferiores, respectivamente. Assim, de acordo com o tipo da variação, qualquer valor acima destes foi considerado significativo.

Tabela 37- Valores obtidos em cada variação no teste de Plackett-Burman para o método de CLAE

Fatores variados para níveis superiores		Fatores variados para níveis inferiores	
Efeito	Teor (%) ^{1,2}	Efeito	Teor (%) ^{1,2}
Temperatura da sala (0 = 25 °C; 1 = 27 °C)	101,95 - 102,04 = -0,09	Temperatura da sala (0 = 25 °C; -1 = 23 °C)	101,78 - 100,74 = 1,04
Vazão da fase móvel (0 = 0,6 mL/min; 1 = 0,62 mL/min)	102,44 - 101,56 = 0,88	Vazão da fase móvel (0 = 0,6 mL/min; -1 = 0,58 mL/min)	101,11 - 100,92 = 0,19
Marca do etanol (0 = J. T. Baker; 1 = Tedia)	101,40 - 102,59 = -1,19	Marca do etanol (0 = J. T. Baker; -1 = Panreac)	100,30 - 101,74 = -1,44
Proporção da fase móvel (água:etanol) (0 = 45:55; 1 = 43:57)	102,22 - 101,77 = 0,46	Proporção da fase móvel (água:etanol) (0 = 45:55; -1 = 47:53)	101,03 - 101,00 = 0,03
Fonte de água (0 = Laboratório 2; 1 = Laboratório 1)	101,51 - 102,48 = -0,96	Fonte de água (0 = Laboratório 2; -1 = Laboratório 3)	101,14 - 100,89 = 0,26
Comprimento de onda (0 = 221 nm; 1 = 223 nm)	102,08 - 101,92 = 0,16	Comprimento de onda (0 = 221 nm; -1 = 219 nm)	101,58 - 100,36 = 1,23
pH da fase móvel (0 = 4,5; 1 = 4,7)	102,28 - 101,71 = 0,57	pH da fase móvel (0 = 4,5; -1 = 4,3)	101,17 - 100,86 = 0,31

¹ Média de teores obtidos nas condições normais - Média de teores obtidos nas condições alteradas

² Critérios de referência calculados: 1,43 para o teste 1 e 1,54 para o teste -1

6.3.4.2.5. Seletividade e estudo de degradação forçada

6.3.4.2.5.1. Análise da interferência do excipiente

A seletividade do método quanto à interferência do excipiente foi avaliada em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de CLAE. Os resultados estão descritos no item 5.5.4.2 e na Figura 15.

6.3.4.2.5.2. Estudo de degradação forçada

O estudo da degradação forçada da amostra de daptomicina em pó para solução injetável foi realizado para verificar a seletividade e as propriedades indicadoras de

estabilidade do método proposto. Em todas as condições de estresse pelas quais a amostra foi submetida, houve decréscimo do pico da daptomicina, sugerindo degradação do fármaco. A amostra foi mais estável em condição fotolítica, na qual foram necessários 7 dias para obter degradação de 16% e apresentou maior degradação em condição alcalina, na qual no tempo zero já apresentou uma degradação de 16,06%.

A Tabela 38 apresenta os dados obtidos no estudo de degradação forçada da amostra. As Figuras 27 a 31 apresentam alguns cromatogramas obtidos durante o estudo de estabilidade da daptomicina. Para cada degradação, estão apresentados um cromatograma com a degradação entre 5 e 20%, que é o recomendado para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade (BLESSY et al., 2013), e também um outro cromatograma apresentando produtos de degradação, nos casos em que eles não surgiram dentro da faixa recomendada de degradação ou surgiram de maneira discreta (como é o caso da degradação alcalina). A exceção é a degradação fotolítica (Figura 31), na qual só após 7 dias houve a porcentagem de degradação aceitável (entre 5 e 20%) e este foi o último dia da análise, portanto apenas um cromatograma está apresentado.

Tabela 38- Estudo de degradação forçada da amostra de daptomicina em pó para solução injetável para avaliação da seletividade do método de CLAE

Degradação	Tempo (h)	Área remanescente do pico principal de daptomicina (%)	Tempos de retenção dos novos picos (min)
Alcalina	0	85,07	-
	0,25	80,44	6,836
	0,50	73,41	6,778
	1,5	50,85	6,343
	3,0	50,70	6,360
	6,0	36,31	6,390
	24,0	14,27	6,288
	48,0	2,02	6,270
Ácida	0	100,75	-
	0,25	92,52	-
	0,50	65,00	-
	1,5	65,63	-
	3,0	65,90	-
	6,0	32,95	4,750
	24,0	29,46	4,657
	48,0	24,39	4,560
Aquosa	0	99,88	-
	0,25	99,56	-
	0,50	98,98	-
	1,5	98,01	-
	3,0	97,67	-
	6,0	87,07	6,748
	24,0	80,86	6,855
	48,0	65,11	6,835
Oxidativa	0	98,88	-
	0,25	94,37	-
	0,50	90,06	-
	1,5	84,59	-
	3,0	80,28	4,96
	6,0	71,43	5,122
	24,0	13,83	3,259 e 5,190
	48,0	0,57	3,257; 3,887 e 5,181
Fotolítica	0	100,00	-
	0,25	99,92	-
	0,50	99,98	-
	1,5	99,73	-
	3,0	98,51	-
	6,0	99,88	-
	24,0	99,97	-
	48,0	99,50	-
	7 dias	83,93	3,214

Figura 27- Cromatogramas da amostra de daptomicina em pó para solução injetável (40 µg/mL) submetida à degradação em meio ácido (HCl 0,01 M) a 60 °C. a) Após 0,25 h; b) Após 24 h. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm). DPT: daptomicina. DEG: produto de degradação.

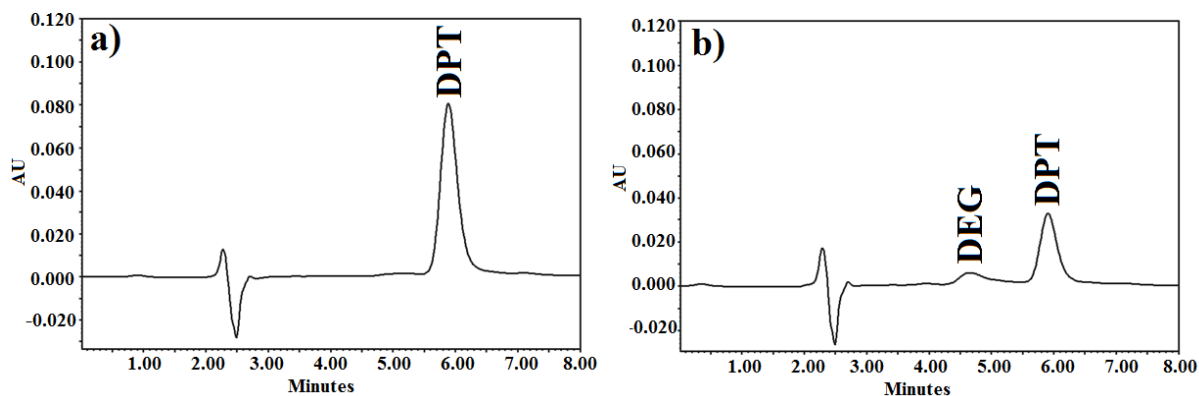


Figura 28- Cromatogramas da amostra de daptomicina em pó para solução injetável (40 µg/mL) submetida à degradação em meio alcalino (NaOH 0,001 M) a 60 °C. a) Após 0,25 h; b) Após 1,5 h. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm). DPT: daptomicina. DEG: produto de degradação.

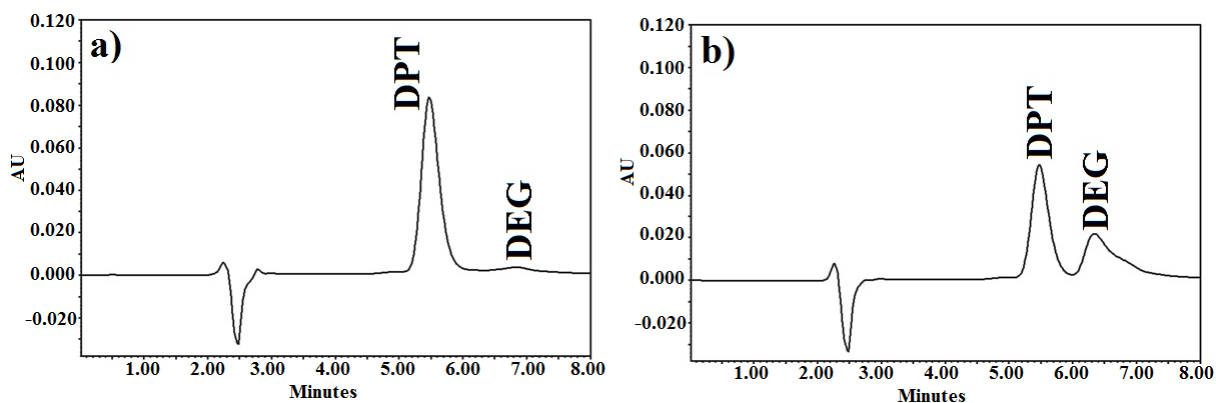


Figura 29- Cromatogramas da amostra de daptomicina em pó para solução injetável (40 µg/mL) submetida à degradação em meio aquoso (H₂O) a 60 °C. a) Após 6 h; b) Após 24 h. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm). DPT: daptomicina. DEG: produto de degradação.

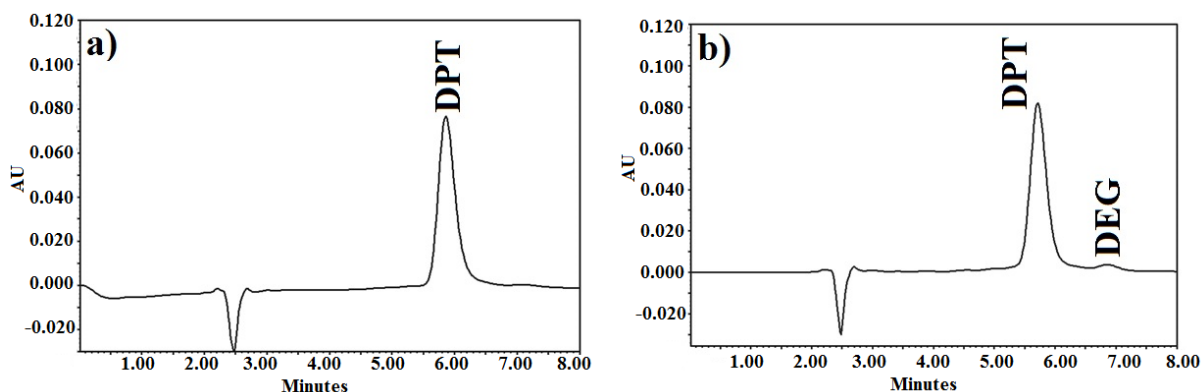


Figura 30- Cromatogramas da amostra de daptomicina em pó para solução injetável (40 µg/mL) submetida à degradação em meio oxidativo (H₂O₂ 0,3%) a 60 °C. a) Após 3 h; b) Após 24 h. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm). DPT: daptomicina. DEG: produto de degradação. H₂O₂: picos gerados pelo peróxido de hidrogênio.

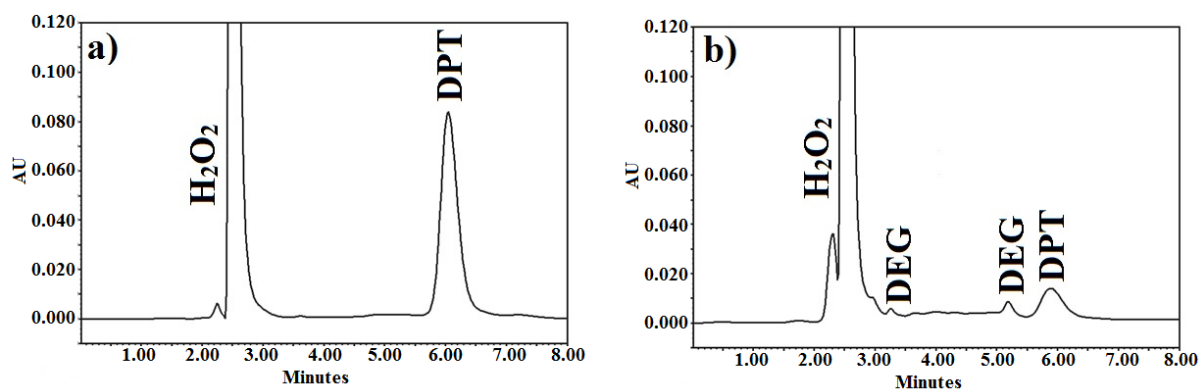
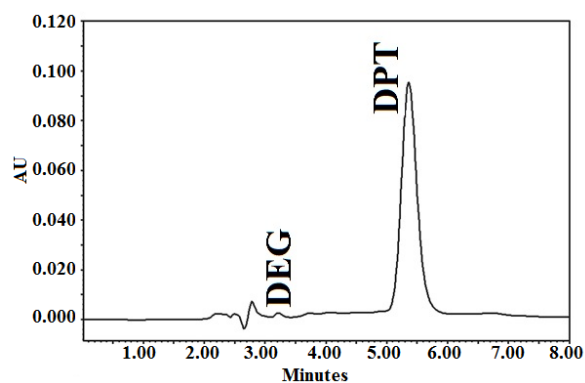


Figura 31- Cromatograma da amostra de daptomicina em pó para solução injetável (40 µg/mL) submetida à degradação em meio fotolítico (luz UVC) após 7 dias. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm). DPT: daptomicina. DEG: produto de degradação.



Em relação aos cromatogramas apresentados nas Figuras de 27 a 31, foram realizadas análises dos picos da daptomicina em equipamento de CLAE acoplado a detector por arranjo de diodos, para verificar a sua pureza e se há interferência de algum produto de degradação. Os resultados estão apresentados na Tabela 39.

Tabela 39- Análise da pureza dos picos de daptomicina após a degradação forçada

Degradação	Tempo(h)	Pureza detectada (%)
Ácida	0,25	99,99
	24,0	99,98
Alcalina	0,25	100,00
	1,5	99,99
Aquosa	6,0	99,99
	24,0	99,99
Oxidativa	3,0	100,00
	24,0	100,00
Fotolítica	7 dias	100,00

6.3.4.2.6. LD e LQ

Os limites de detecção e quantificação foram estimados para determinar a sensibilidade do método. O valor calculado para o limite de detecção foi de 1,87 µg/mL e para o limite de quantificação de 5,68 µg/mL.

6.3.4.2.7. Teste de conformidade do sistema cromatográfico

O teste de conformidade do sistema cromatográfico foi realizado em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de CLAE e os resultados obtidos estão descritos no item 5.5.4.1 (Tabela 9).

6.3.5. Discussão

A cromatografia líquida de alta eficiência é um método que possui muitas aplicações na ciência, entre elas o acompanhamento de sínteses, em análises de pesticidas, no isolamento de produtos naturais e sintéticos, no monitoramento da produção e qualidade de medicamentos, entre outras. A sua ampla gama de aplicações e a sua versatilidade são decorrentes principalmente da grande variedade existente de fases móveis e estacionárias (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). Também existem vários detectores utilizados em CLAE, no entanto, um dos mais utilizados é o detector de ultravioleta. Este é capaz de monitorar a estabilidade de fármacos e formulações farmacêuticas, detectando seus produtos de degradação.

São encontrados trabalhos na literatura em que a técnica de CLAE foi desenvolvida para a análise de daptomicina, no entanto, a maior parte deles diz respeito à quantificação deste fármaco em fluidos biológicos, tais como sangue total, plasma, urina e fluido peritoneal (TOBIN et al., 2008; MARTENS-LOBENHOFFER et al., 2009; OLSZOWY et al., 2010; POLILLO et al., 2010; BAIETTO et al., 2010; GIKA et al., 2010; VERDIER et al., 2011; SZULTKA et al., 2013). Recentemente, Christ e colaboradores (2014) publicaram o primeiro trabalho em que foi desenvolvido um método analítico para análise da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado para solução injetável, no qual utilizaram como fase móvel uma mistura de solventes orgânicos potencialmente tóxicos (metanol e acetonitrila) e solução tampão, a qual pode precipitar e causar problemas de entupimento em colunas analíticas e em todo o sistema cromatográfico. Além disso, o pH da fase móvel foi ajustado para um nível extremamente ácido (2,2), o que também pode contribuir para reduzir a vida útil do sistema cromatográfico. Outro trabalho, publicado por Gong e colaboradores (2014), também desenvolveu um método de análise da daptomicina em pó liofilizado. No entanto, os autores também utilizaram acetonitrila como a fase orgânica da fase móvel.

Assim, foi desenvolvido um novo método de CLAE para análise quantitativa da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado, otimizada em relação aos trabalhos

descritos na literatura para esta finalidade. No método desenvolvido, foi utilizado o etanol como a fase orgânica da fase móvel, já que é um solvente ambientalmente favorável, apresenta fácil descarte e ainda oferece menos riscos para a saúde dos operadores que outros solventes mais comumente usados para esta finalidade (RIBEIRO et al., 2004). Também não se fez o uso de soluções tampão em sua composição, favorecendo o aumento da vida útil do sistema cromatográfico e ainda reduzindo o gasto de energia elétrica e solventes por análise, já que uso de tampões demandaria longas lavagens do sistema cromatográfico após o seu uso, o que não é necessário neste caso. O desenvolvimento do método foi discutido com maiores detalhes no item 5.5.5 deste trabalho.

Os testes de conformidade do sistema (Tabela 9, seção 5.5.4.1) mostraram que os parâmetros cromatográficos escolhidos para a análise são capazes de fornecer resultados com precisão e exatidão confiáveis, visto que o número de pratos foi superior a 2000, dentro do recomendado, e os valores médios dos fatores de assimetria e de cauda estiveram abaixo do valor-limite de 2,0. Além disso, o valor médio calculado para o fator de retenção também se mostrou apropriado, acima de 2,0. O ICH (2005) não apresenta valores de referência para os parâmetros analisados, portanto os valores de referência para estes testes foram baseados naqueles sugeridos pelo FDA para a validação de métodos cromatográficos (FDA, 1994). Os outros parâmetros cromatográficos foram validados de acordo com o ICH (2005) e a legislação brasileira (BRASIL, 2003).

A linearidade do método foi constatada no intervalo de 20,0 a 70,0 µg/mL. Os valores para o intercepto e a inclinação da curva analítica foram 46800 e 55626, respectivamente, com coeficiente de correlação de 0,9996, o que mostra a adequada linearidade do método. A análise estatística (Tabela 34) mostrou que o método apresentou regressão linear significativa, visto que o valor de F calculado (12002,55) foi superior ao de F tabelado (4,75) para este quesito. Além disso, a análise estatística mostrou que não houve desvio significativo da linearidade, já que o F calculado (0,00) foi menor que o F tabelado (3,26). Esta análise foi realizada a um nível de significância de 5%.

O método apresentou precisão adequada, visto que os valores de DPR% para os parâmetros intradia, interdias e entre-analistas foram 1,85%, 1,44% e 1,42%, respectivamente, os quais se encontram abaixo de 2,0%. O método também mostrou exatidão apropriada, visto que apresentou valor experimental médio de recuperação de 99,98%, como mostra a Tabela 36.

A robustez do método foi comprovada por meio do modelo de Plackett-Burman (Tabela 37). Através deste ensaio, foi verificado que nenhuma alteração realizada nos parâmetros de trabalho foi considerada significativa em comparação com os valores de referência calculados durante a execução do teste. Isto mostrou que pode haver pequenas alterações na temperatura da sala, na vazão, na marca do etanol, na proporção da fase móvel, na fonte de água, no comprimento de onda e no pH da fase móvel sem que ocorram mudanças significativas no resultado final fornecido pelo método.

A seletividade do método foi analisada de duas maneiras: quanto à interferência do excipiente na análise da daptomicina e quanto à interferência de produtos de degradação formados após a amostra ser submetida a condições forçadas de degradação, já que se trata de um método indicativo de estabilidade. Em ambos os casos, a seletividade do método foi demonstrada, pois tanto o excipiente quanto os produtos de degradação formados não interferiram na análise da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado. Este dado foi confirmado por meio de análise de pureza dos picos de daptomicina em equipamento de CLAE acoplado a detector de arranjo de diodos, o qual confirmou a sua pureza em todos os casos.

A degradação forçada de fármacos é necessária para demonstrar não só a seletividade de métodos indicativos de estabilidade, mas também para revelar o comportamento da molécula em relação a diferentes condições de pH e temperatura, e estas informações podem auxiliar no desenvolvimento de novas formulações e na escolha do melhor material para acondicionamento das mesmas (BLESSY et al., 2013).

Durante o desenvolvimento deste trabalho, a amostra de daptomicina foi submetida a condições forçadas de degradação em meios ácido, alcalino, aquoso, oxidativo e fotolítico. Em todas as condições de estresse pelas quais a amostra foi submetida, houve decréscimo do pico da daptomicina e a formação de novos picos nos cromatogramas. A amostra foi mais estável em condição fotolítica, na qual foram necessários 7 dias para degradação de 16,06%, e apresentou maior degradação em condição alcalina, na qual logo após o preparo da solução em NaOH 0,001 M a daptomicina já havia degradado cerca de 14,93%. Existem dados na literatura que mostram a instabilidade da daptomicina em condições alcalinas (MUANGSIRI; KIRSCH, 2001; CHRIST et al., 2012).

A questão de quanto se deve degradar o fármaco gera controvérsias e não é muito bem estabelecida. Em geral, para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, o aceitável é uma degradação na faixa de 5 a 20%. Submeter a molécula à degradação superior

a 20% pode levar à formação de produtos de degradação secundários, os quais dificilmente seriam encontrados em condições normais de prateleira, não sendo considerados, por este motivo, produtos de interesse (ALSANTE et al., 2007; BLESSY et al., 2013). Já a legislação brasileira aceita degradação na faixa de 10 a 30% para o mesmo propósito (BRASIL, 2012).

Considerando uma degradação de 5-20%, as Figuras 27 (a), 28 (a), 29 (a) e 30 (a) apresentam os cromatogramas obtidos nestas condições após as degradações ácida, alcalina, aquosa e oxidativa, respectivamente. A Figura 31 apresenta o cromatograma para a degradação fotolítica. Analisando-se estas figuras, percebe-se que nas condições ácida, aquosa e oxidativa não houve o surgimento de picos extras nos cromatogramas, embora a área do pico principal da daptomicina já tenha indicado uma degradação na faixa de 5 a 20%, como o recomendado. Existem algumas explicações para este fato, tais como: o produto de degradação pode ter apresentado eluição tardia nas condições cromatográficas propostas e por tal motivo não ter aparecido no tempo de corrida estabelecido (8 minutos); ele pode ter se ligado fortemente no interior da coluna analítica não sendo arrastado pela fase móvel; pode não apresentar um cromóforo; pode ser altamente volátil; entre outros (TEMPLETON; PADEIRO, 2014).

Como nas condições ácida, aquosa e oxidativa, após a degradação de 5-20% não foram observados produtos de degradação, as Figuras 27 (b), 29 (b) e 30 (b) apresentam cromatogramas correspondentes as estas degradações em um nível superior, quando foi possível observar estes produtos. A Figura 28 (b) também apresenta um cromatograma, referente à degradação alcalina, na qual o fármaco sofreu degradação superior à 20%, onde o produto de degradação apareceu de maneira mais pronunciada. O objetivo foi mostrar que estes produtos de degradação não interferiram na análise da daptomicina. Além disso, análise dos picos da daptomicina mostraram pureza superior a 99,98% em todos os casos, confirmando que não há interferência de produtos de degradação na análise deste antimicrobiano.

Por fim, o método proposto cumpre todos os requisitos preconizados pela literatura para validação de um método cromatográfico indicativo de estabilidade, sendo capaz de quantificar daptomicina em pó liofilizado para preparações injetáveis, além de ser capaz de avaliar sua estabilidade, podendo ser uma alternativa mais econômica, segura para os operadores e ambientalmente favorável para análises de rotina do controle de qualidade deste fármaco.

Este trabalho gerou um artigo científico, o qual foi publicado em revista internacional: TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development, optimization, and validation of a green and stability-indicating HPLC method for determination of daptomycin in lyophilized powder. **Journal of AOAC International**, v. 98, p. 1276-1285, 2015.

6.4. Eletroforese capilar indicativa de estabilidade

6.4.1. Considerações gerais

A eletroforese capilar é um método físico de separação que vem sendo cada vez mais utilizado na atualidade. Nesta técnica, a separação de compostos iônicos ou ionizados presentes em uma mistura ocorre dentro dos limites de um capilar, sob a influência de um campo elétrico. Os solutos, neste caso, estão dissolvidos na solução eletrolítica, a qual é eficaz condutora de eletricidade (PETERSEN; MOHAMMAD, 2001; FB, 2010; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

Na eletroforese capilar, as forças que governam o processo de separação são a mobilidade eletroforética e o fluxo eletroosmótico (FEO) (FB, 2010; SUNTORNUSUK, 2010). Quanto à mobilidade eletroforética, todo íon em solução possui uma mobilidade que é característica a ele. Esta mobilidade é determinada pela força elétrica que as espécies ionizadas, moléculas ou partículas, sofrem, balanceada com as forças de fricção geradas pela passagem das espécies pelo meio (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

A velocidade da mobilidade eletroforética (V_{me}) de um íon pode ser determinada através da Equação 17 (FB, 2010; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

$$V_{me} = \left(\frac{q}{6\pi\eta r} \right) \times E \quad \text{Equação 17}$$

Na qual:

q = carga do íon

η = viscosidade da solução

r = raio iônico

E = campo elétrico aplicado

Através da Equação 17, observa-se que o movimento dos íons no capilar está relacionado a fatores inerentes ao soluto e ao eletrólito no qual a imigração ocorre. Espécies menores e mais carregadas possuem maior mobilidade. Em contrapartida, espécies com maiores raios iônicos e menos carregadas apresentam mobilidade mais lenta. Em relação ao

eletrólito, quanto maior sua viscosidade, menor será a mobilidade eletroforética. Como o grau de ionização do soluto pode ser definido pelo seu pKa, a mobilidade efetiva é também altamente dependente do pH e da composição do eletrólito de corrida (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

Como dito anteriormente, além da mobilidade eletroforética, outra força direciona os solutos através do capilar, denominada fluxo eletroosmótico (FEO). Devido ao FEO, os solutos são conduzidos pelo capilar em direção ao detector, sem distinção de carga. Assim, é possível realizar a análise simultânea de amostras contendo solutos catiônicos, neutros e aniônicos (TAVARES, 1997). Sem esta força adicional, compostos com carga positiva migrariam pelo capilar enquanto os ânions permaneceriam à distância do detector e os solutos neutros simplesmente não migrariam (FB, 2010).

A interação entre a solução e a superfície interna do capilar de sílica fundida gera o FEO. A sílica fundida apresenta vários tipos de grupos silanóis (-SiOH), os quais possuem caráter ácido. Quando entram em contato com o meio aquoso, em pH acima de três, alguns deles são ionizados, transformando-se em silanoatos (Si-O-) e tornando a superfície interna do capilar negativamente carregada, enquanto os íons H⁺ liberados difundem-se para o seio da solução que preenche o capilar. Os grupos silanóis atraem os cátions do eletrólito, formando uma dupla camada interna na parede do capilar, que é essencialmente estática. Uma camada de cátions mais difusa, próxima à dupla camada, também é formada. Quando um campo elétrico é aplicado, os cátions migram em direção ao cátodo e, ao migrarem, transportam moléculas de água, induzindo o fluxo da solução como um todo nesta direção. Trata-se do FEO normal (COLAMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997; FB, 2010; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

A velocidade do FEO pode ser definida pela Equação 18.

$$V_{FEO} = \left(\frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) \times E \quad \text{Equação 18}$$

Na qual:

ϵ = constante dielétrica do eletrólito

ζ = potencial zeta da superfície do capilar

η = viscosidade da solução

E = campo elétrico aplicado

O potencial zeta é um parâmetro muito importante para o entendimento do FEO e o mecanismo pelo qual a superfície do capilar responde às mudanças na composição do eletrólito. Este parâmetro é determinado pela carga na superfície do capilar. A ionização dos grupos silanóis é dependente do pH, assim, em valores de pH mais elevados, os grupos silanóis estão mais desprotonados, então a magnitude do FEO é maior. O contrário ocorre em valores de pH baixos, onde os grupos silanóis estão menos ionizados (TAVARES; MCGUFFIN, 1995; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

Além do pH, a viscosidade da solução também interfere na velocidade do FEO, assim como ocorre na mobilidade eletroforética dos solutos. Desta forma, o analista pode controlar o FEO através de alterações no pH, concentração, constante dielétrica, força iônica e/ou viscosidade do eletrólito.

Dentro do capilar, o FEO possui um perfil radial, ou seja, o componente velocidade é adicionado a todos os analitos de forma homogênea, independente de suas posições radiais. Isto contribui para o não alargamento das bandas e separações com maior eficiência que métodos cromatográficos em fase líquida, os quais possuem um perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo gerado por pressão (COLAMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997; PETERSEN; MOHAMMAD, 2001; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

A eletroforese capilar é uma técnica versátil, que apresenta um vasto campo de aplicação (TAVARES, 1997; SUNTORNSUK, 2010; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). Pode ser empregada para separar desde pequenas e simples moléculas, orgânicas e inorgânicas, até aquelas mais volumosas e complexas, como proteínas e ácidos nucleicos. Além disso, possui baixo custo analítico, simplicidade de operação e manuseio, as análises geralmente são rápidas (principalmente em comparação com métodos cromatográficos), além de utilizar uma quantidade muito baixa de reagentes e solventes orgânicos, considerando que o solvente mais utilizado para a execução desta técnica é a água (e em pequenos volumes). Desta forma, gera poucos resíduos e toxicidade para operadores e meio ambiente, sendo considerada uma técnica ambientalmente favorável (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

Até o momento, não existem trabalhos na literatura que descrevam o uso deste método para análise da daptomicina em nenhum tipo de matriz. Considerando todas as vantagens ambientais e analíticas que esta técnica oferece, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e validação de método de eletroforese capilar para análise da daptomicina em pó liofilizado para solução injetável.

6.4.2. Material

Para a análise cromatográfica foram utilizadas daptomicina SQR e daptomicina em pó liofilizado para preparações injetáveis descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente.

Os eletrólitos de corrida utilizados neste trabalho foram preparados a partir de água ultrapurificada obtida através de equipamento Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, EUA). Fosfato de potássio dibásico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e fosfato de potássio monobásico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) também foram utilizados para o preparo do eletrólito de corrida. O eletrólito, depois de preparado, foi submetido à degaseificação em banho ultrassônico SoniClean 2PS (Sanders Medical, Santa Rita do Sapucaí, Brasil), por 10 minutos. Todas as soluções foram filtradas empregando membrana de 0,45 µm (Pall Corporation, Michigan, EUA) antes de serem submetidas à análise.

Para os estudos de degradação forçada, foram utilizados os seguintes materiais: HCl (Qhemis, São Paulo, Brasil), NaOH (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), solução de H₂O₂ 0,3% (Impex, Varginha, Brasil) e câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm) com lâmpada UVC (254 nm) 20 W. O equipamento de eletroforese capilar usado foi o P/AC[®] MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter, Brea, EUA), com detector por arranjo de diodos (DAD). O *software Karat* foi utilizado para a análise dos eletroferogramas.

As análises foram realizadas em capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm. O *software Microsoft Excel* (2013) foi utilizado para a construção da curva analítica.

Os seguintes equipamentos também foram utilizados: banho-maria modelo Q334M (Quimis, Diadema, Brasil); balança analítica modelo CPA225D (Sartorius, Göttingen, Alemanha); micropipetador modelo 20-200 µL (Digipet, Curitiba, Brasil).

6.4.3. Método

6.4.3.1. Ensaios preliminares

Os ensaios preliminares para definição das melhores condições eletroforéticas foram realizados durante o desenvolvimento de método de eletroforese capilar para a análise qualitativa da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado. Estas informações estão disponíveis no item 5.6 deste trabalho.

As condições eletroforéticas escolhidas foram descritas na Tabela 11, presente no item 5.6.3.5 deste trabalho.

6.4.3.2.Preparo do eletrólito de corrida

Solução tampão fosfato de potássio 15 mM pH 7,0 foi preparada de acordo com o descrito na Farmacopeia Brasileira (2010). Após o preparo, a solução foi filtrada empregando membrana de 0,45 μ m e levada ao ultrassom por 10 minutos para degaseificação antes do uso.

6.4.3.3.Condicionamento do capilar

O condicionamento inicial do capilar foi realizado através de lavagens de 20 minutos com cada uma das soluções a seguir, exatamente nesta ordem: solução de NaOH 0,1 M, água ultrapurificada, solução de NaOH 0,1 M, água ultrapurificada e eletrólito de corrida. O condicionamento diário do capilar consistiu em lavagens com solução de NaOH 0,1 M, água ultrapurificada e eletrólito por 10 minutos, cada um. Para as demais corridas, o capilar foi submetido ao pré-condicionamento por meio de lavagem com NaOH 0,1 M, água e eletrólito, por 30 segundos, 30 segundos e 1 minuto, respectivamente.

6.4.3.4.Obtenção da curva analítica

Para a realização da curva analítica, foram pesados analiticamente o equivalente a 10,0 mg de daptomicina SQR, depois transferidos para balão volumétrico de 20 mL e o volume foi completado com água ultrapurificada, para obtenção de solução estoque com concentração teórica de 500 μ g/mL. Alíquotas de 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 e 0,35 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 1 mL, e os volumes foram completados com água ultrapurificada, para obtenção das soluções de trabalho com as concentrações de 50, 75, 100, 125, 150 e 175 μ g/mL de daptomicina SQR. Cada concentração foi preparada em triplicata e submetida à filtração através de membrana de 0,45 μ m antes das injeções. A curva analítica foi construída, com auxílio do *software Microsoft Excel* (2013), através da disposição das concentrações das soluções de trabalho de daptomicina SQR em relação às respectivas médias das alturas dos picos obtidas para cada uma delas. Este procedimento foi realizado três dias diferentes e uma curva analítica final com a média dos três dias foi construída.

6.4.3.5. Determinação de daptomicina na amostra de pó liofilizado para solução injetável

6.4.3.5.1. Preparo da solução de daptomicina SQR

Foi preparada uma solução estoque de daptomicina SQR na concentração de 500 µg/mL, como descrito no item 6.4.3.2. Foram transferidos volumes de 0,20 mL desta solução estoque para balões volumétricos com capacidade de 1 mL e os volumes foram completados com água ultrapurificada para obtenção de soluções de trabalho com a concentração de 100,0 µg/mL. O preparo das soluções foi realizado em triplicata e estas foram submetidas à filtração antes das injeções.

6.4.3.5.2. Preparo da solução de daptomicina amostra

Foi preparada uma solução estoque de daptomicina amostra na concentração teórica de 500 µg/mL. Para isso, primeiramente foi verificado o peso médio de três frascos-ampola de daptomicina (descritos no item 4.3) e preparado um *pool* de amostras, conforme descrito no item 5.3.2.1.3.1. A partir deste *pool*, o equivalente a 10,0 mg de daptomicina foi analiticamente pesado e transferido para balão volumétrico de 20 mL. O volume do balão volumétrico foi completado com água ultrapurificada para obtenção de solução estoque de 500 µg/mL.

Foram transferidos volumes de 0,2 mL desta solução estoque para balões volumétricos com capacidade de 1 mL cujos volumes foram completados com água ultrapurificada para obtenção de soluções de trabalho com a concentração teórica de 100,0 µg/mL. O preparo das soluções foi realizado em triplicata e estas foram submetidas à filtração antes das injeções.

6.4.3.5.3. Cálculo do teor de daptomicina na amostra

A concentração de daptomicina na amostra foi calculada pela Equação 7 e o seu teor percentual foi calculado pela Equação 8. Estas equações foram descritas anteriormente no item 6.1.3.3.3 deste trabalho.

6.4.3.6. Validação do método

O método foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade, limites de detecção e de quantificação e

conformidade do sistema cromatográfico, de acordo com o preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014).

6.4.3.6.1. Linearidade

Para a análise da linearidade do método, foram avaliadas três curvas analíticas, realizadas em três dias diferentes. Cada curva foi construída de acordo com o descrito no item 6.4.3.2. Os resultados obtidos foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada por análise de variância (ANOVA).

6.4.3.6.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois quesitos: a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade (intradia) foi estudada através da análise de seis soluções de daptomicina SQR na concentração de 100,0 µg/mL, no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. O valor do desvio padrão relativo percentual (DPR%) entre as determinações foi avaliado. A precisão intermediária (interdias e entre-analistas), por sua vez, foi avaliada através da realização de determinações do teor de daptomicina na amostra de pó para solução injetável em três dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados (ICH, 2005).

6.4.3.6.3. Exatidão

A exatidão do método foi realizada através do ensaio de recuperação, no qual quantidades conhecidas de daptomicina SQR foram adicionadas a quantidades conhecidas de amostra (ICH, 2005). A recuperação foi realizada em três níveis, R1, R2 e R3, e as soluções foram preparadas segundo a Tabela 40, em triplicata.

Tabela 40- Preparo das soluções para o teste de recuperação do método de eletroforese capilar para daptomicina

	Daptomicina amostra (500 µg/mL) (mL)	Daptomicina SQR (500 µg/mL) (mL)	Concentração teórica final (µg/mL) ^{1,2}
Amostra	0,10	-	50
R1	0,10	0,06	80
R2	0,10	0,10	100
R3	0,10	0,14	120
Padrão	-	0,10	50

¹ Balão volumétrico de 1 mL

² Cada nível de concentração foi preparado em triplicata

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada através da Equação 9, determinada pela AOAC (AOAC, 2002) e descrita na seção 6.1.3.4.3 deste trabalho.

6.4.3.6.4. Robustez

Para a avaliação da robustez do método, foi utilizado o modelo fatorial de Plackett-Burman, baseado em uma matriz de 15 experimentos, variando-se 7 parâmetros em níveis superiores e inferiores em relação aos de trabalho. A Tabela 31, descrita no item 6.3.3.4.4 deste trabalho, apresenta a combinação fatorial proposta por este modelo, onde as letras de A a G representam os fatores (parâmetros de trabalho escolhidos para serem variados) e os números de 1 a 15 representam o número de experimentos ($2n + 1$), sendo que n é o número de fatores. O número zero corresponde aos parâmetros normais que foram previamente estabelecidos durante a validação do método, enquanto os números 1 e -1 correspondem aos níveis superiores e inferiores que foram variados em relação aos parâmetros normais (BERZAS et al., 2004).

Os parâmetros de trabalho (fatores) e os níveis selecionados para o ensaio realizado estão apresentados na Tabela 41.

Tabela 41- Fatores e níveis de variação selecionados para avaliação da robustez do método de eletroforese capilar para análise de daptomicina

	Fator	Unidade	Condição variada (-1)	Condição normal (0)	Condição variada (+1)
A	Comprimento de onda	nm	198	200	202
B	Temperatura do cartucho	°C	24	25	26
C	Tensão	kV	14	15	16
D	Lavagem do capilar com NaOH 0,1 M	s	25	30	35
E	Lavagem do capilar com água	s	25	30	35
F	Lavagem do capilar com eletrólito de corrida	s	55	60	65
G	Concentração do eletrólito de corrida	mM	13	15	17

0: fator sem variação

1: fator variado para nível superior

-1: fator variado para nível inferior

O modelo fatorial de Plackett-Burman foi descrito detalhadamente neste trabalho para a avaliação da robustez do método de CLAE, no item 6.3.3.4.4. O procedimento realizado para o método de eletroforese capilar foi exatamente o mesmo, por isso não será descrito novamente.

6.4.3.6.5. Seletividade e estudo de degradação forçada

A seletividade do método de eletroforese capilar foi demonstrada de duas maneiras: na primeira, mostrando que o excipiente presente na forma farmacêutica de pó liofilizado não interfere na análise da daptomicina; na segunda, submetendo a amostra de daptomicina a condições forçadas de estresse e demonstrando que os produtos de degradação formados também não interferem com a análise do fármaco.

6.4.3.6.5.1. Análise da interferência do excipiente

A seletividade do método quanto à interferência do excipiente foi avaliada em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de eletroforese capilar e o método foi descrito no item 5.6.3.7.

6.4.3.6.5.2. Estudo de degradação forçada

Soluções de amostra de daptomicina (100 µg/mL) foram submetidas à degradação forçada por condições ácida, alcalina, aquosa, oxidativa e fotolítica, com os objetivos de avaliar se o sistema eletroforético escolhido é capaz de detectar a degradação da daptomicina na forma farmacêutica de pó para solução injetável, revelar a presença de possíveis produtos de degradação e demonstrar que estes produtos não interferem na análise da daptomicina, demonstrando a seletividade do método.

A solução amostra foi preparada em HCl 0,01 M e NaOH 0,001 M para as hidrólises ácida e alcalina, respectivamente. As amostras foram aquecidas a 60 °C. A degradação aquosa foi realizada através da exposição de solução aquosa da amostra à temperatura de 60 °C, em banho-maria. Para a degradação oxidativa, a solução amostra foi preparada em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% (p/v) e depois foi submetida à temperatura de 60 °C. A fotodegradação foi induzida através da exposição de uma solução aquosa da amostra à luz ultravioleta, utilizando câmara espelhada internamente (100 x 16 x 16 cm), com lâmpada UVC (254 nm) 20 W.

Para se calcular a porcentagem de degradação, foram comparadas as áreas dos picos obtidos com a daptomicina íntegra e após as degradações. Os tempos de análise foram 0; 0,25; 0,50; 1,5; 3,0; 6,0; 24,0 e 48,0 horas. No caso da degradação fotolítica, realizadas análises por 7 dias.

Após todas as condições forçadas de degradação, foi realizada uma análise da pureza dos picos da daptomicina para verificar se houve a interferência de algum produto de degradação na análise do fármaco.

6.4.3.6.6. LD e LQ

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados pelas Equações 10 e 11, respectivamente, descritas no item 6.1.3.4.6, com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva (ICH, 2005).

6.4.3.6.7. Teste de conformidade do sistema cromatográfico

O teste de conformidade do sistema cromatográfico foi realizado em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de eletroforese capilar e o método foi descrito no item 5.6.3.6.

6.4.4. Resultados

6.4.4.1. Ensaios preliminares

Os ensaios preliminares foram realizados em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de eletroforese capilar e os resultados estão descritos na seção 5.6.4.1.

6.4.4.2. Validação do método

6.4.4.2.1. Linearidade

Os valores das áreas obtidas para a curva analítica de daptomicina SQR estão apresentados na Tabela 42.

Tabela 42- Valores das áreas referentes ao pico de daptomicina SRQ para a construção da curva analítica de eletroforese capilar

Concentração (µg/mL)	Altura do pico ¹ (AU)	Altura média ± DP ²	DPR ³ (%)
50,0	7957	7809,89 ± 207,41	2,66
	7573		
	7900		
75,0	11128	10698,22 ± 385,92	3,61
	10585		
	10381		
100,0	13371	13324,44 ± 40,34	0,30
	13302		
	13300		
125,0	15920	15948,00 ± 27,24	0,17
	15974		
	15950		
150,0	18744	18118,89 ± 892,27	4,92
	18516		
	17097		
175,0	20670	20438,67 ± 605,13	2,96
	20894		
	19752		

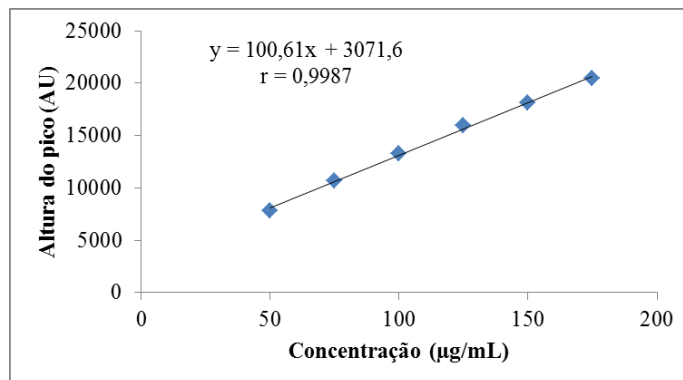
¹ Valor médio de três determinações

² DP: desvio padrão

³ DPR: desvio padrão relativo

Cada valor médio das alturas dos picos obtidas na determinação da curva analítica foi disposto em um gráfico em relação à sua respectiva concentração, conforme ilustrado na Figura 32.

Figura 32- Curva analítica de daptomicina SQR obtida pelo método de eletroforese capilar desenvolvido. Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM; tensão: 15 kV; capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm.



A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de daptomicina SQR está apresentada na Tabela 43.

Tabela 43- Análise de variância dos valores de área determinados na obtenção da curva analítica de daptomicina SQR, utilizando o método de eletroforese capilar

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	5	332942514,70	66588502,94	294,50*	3,11
Regressão linear	1	332942514,70	332942514,70	1472,49*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,00003	0,0000075	0,00	3,26
Resíduo	12	2713301,63	226108,47		
Total	17	335655816,33	-		

*Significativo para $p < 0,05$

6.4.4.2.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em três parâmetros: intradia, interdias e entre-analistas. Os resultados foram expressos com base nos valores de DPR percentuais. A precisão intradia forneceu um valor de DPR de 1,50%. Os valores percentuais de DPR apresentados pelos parâmetros interdias e entre-analistas estão apresentados na Tabela 44.

Tabela 44- Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método para a análise da daptomicina por eletroforese capilar

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre-analistas		
		Massa ¹ (g/frasco)	Teor ¹ (%)	DPR ² (%)		Massa ¹ (g/frasco)	Teor ¹ (%)	DPR ² (%)
1	1	0,515	102,91	2,17	1	0,515	102,91	0,51
	2	0,512	102,38					
	3	0,494	98,87		2	0,518	103,65	

¹ média de três determinações² DPR = desvio padrão relativo**6.4.4.2.3. Exatidão**

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, o qual foi realizado em três níveis de concentração e os resultados estão apresentados na Tabela 45.

Tabela 45- Determinação da exatidão do método analítico para análise de daptomicina por eletroforese capilar

	Daptomicina SQR adicionada (µg/mL)	Daptomicina SQR encontrada ¹ (µg/mL)	Recuperação (%)	DPR ² (%)	Recuperação média (%)
R1	30,0	30,12	100,39	1,12	100,14
R2	50,0	50,44	100,89	0,96	
R3	70,0	69,39	99,13	0,86	

¹ média de três determinações² DPR = desvio padrão relativo (dentro de cada nível de recuperação)**6.4.4.2.4. Robustez**

Na avaliação da robustez pelo modelo Plackett-Burman, foram aplicadas as Equações 14, 15 e 16 para avaliação da significância dos efeitos. Os resultados obtidos nos ensaios estão apresentados na Tabela 46. Os valores de referência obtidos pela Equação 16 foram 1,87 e 1,55, para níveis superiores e inferiores, respectivamente. Assim, de acordo com o tipo da variação, qualquer valor acima destes foi considerado significativo.

Tabela 46- Valores obtidos em cada variação no teste de Plackett-Burman para o método de eletroforese capilar

Fatores variados para níveis superiores		Fatores variados para níveis inferiores	
Efeito	Teor (%) ^{1,2}	Efeito	Teor (%) ^{1,2}
Comprimento de onda (0 = 200 nm; 1 = 202 nm)	104,07 - 102,22 = -1,85	Comprimento de onda (0 = 200 nm; -1 = 198 nm)	101,99 - 102,46 = -0,47
Temperatura do cartucho (0 = 25 °C; 1 = 26 °C)	102,26 - 104,03 = -1,77	Temperatura do cartucho (0 = 25 °C; -1 = 24 °C)	102,18 - 102,28 = -0,10
Tensão (0 = 15 kV; 1 = 16 kV)	102,87 - 103,42 = -0,55	Tensão (0 = 15 kV; -1 = 14 kV)	102,32 - 102,13 = 0,19
Lavagem do capilar com NaOH 0,1 M (0 = 30 s; 1 = 35 s)	102,94 - 103,36 = -0,42	Lavagem do capilar com NaOH 0,1 M (0 = 30 s; -1 = 25 s)	102,18 - 102,27 = -0,05
Lavagem do capilar com água (0 = 30 s; 1 = 35 s)	103,68 - 102,62 = 1,06	Lavagem do capilar com água (0 = 30 s; -1 = 25 s)	102,99 - 101,46 = 1,53
Lavagem do capilar com eletrólito de corrida (0 = 60 s; 1 = 65 s)	103,10 - 103,19 = -0,09	Lavagem do capilar com eletrólito de corrida (0 = 60 s; -1 = 55 s)	102,91 - 101,96 = 0,95
Concentração do eletrólito de corrida (0 = 15 mM; 1 = 17 mM)	102,34 - 103,95 = -1,61	Concentração do eletrólito de corrida (0 = 15 mM; -1 = 13 mM)	101,59 - 102,86 = -1,27

¹ Média de teores obtidos nas condições normais - Média de teores obtidos nas condições alteradas

² Critérios de referência calculados: 1,87 para o teste 1 e 1,55 para o teste -1

6.4.4.2.5. Seletividade e estudo de degradação forçada

6.4.4.2.5.1. Análise da interferência do excipiente

A seletividade do método quanto à interferência do excipiente foi avaliada em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de eletroforese capilar. Os resultados estão descritos no item 5.4.4.2 e na Figura 19.

6.4.4.2.5.2. Estudo de degradação forçada

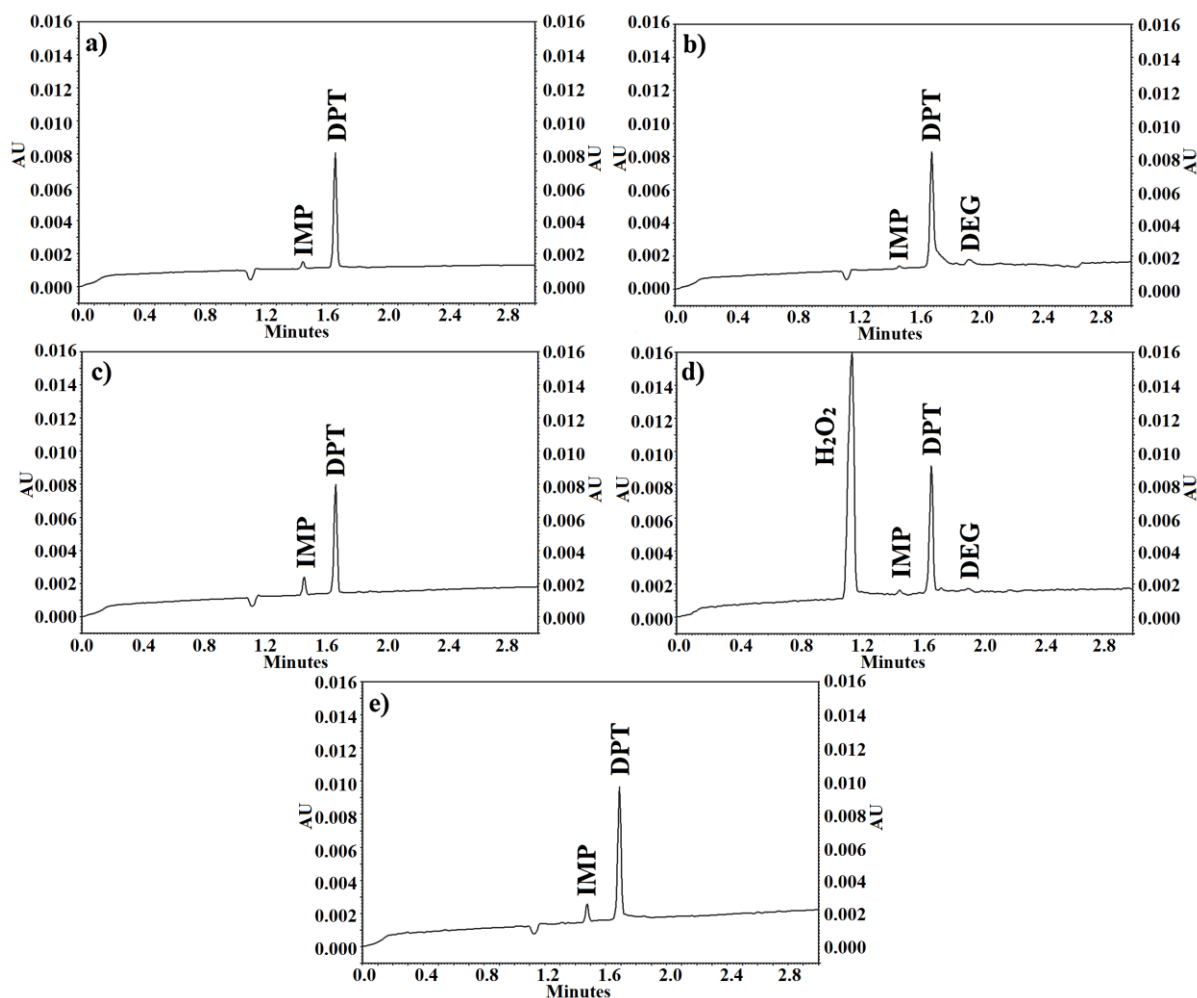
Para verificar a seletividade do método e também a sua propriedade indicadora de estabilidade, um estudo de degradação forçada da amostra de daptomicina foi realizado. A Tabela 47 apresenta os dados obtidos neste estudo.

A Figura 33 apresenta alguns eletroferogramas obtidos durante o estudo de estabilidade da daptomicina. Para cada condição de estresse a qual a amostra de pó liofilizado foi submetida, um eletroferograma está apresentado, com a degradação entre 10 e 30%, que é o recomendado para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade e aceito pela legislação brasileira (BRASIL, 2012).

Tabela 47- Estudo de degradação forçada da amostra de daptomicina em pó para solução injetável para avaliação da seletividade do método de eletroforese capilar

Degradação	Tempo (h)	Área remanescente do pico principal de daptomicina (%)	Tempos de retenção dos novos picos (min)
Alcalina	0	99,47	1,47 e 1,93
	0,25	99,73	1,47
	0,50	85,80	1,47 e 1,74
	1,5	87,38	1,47
	3,0	84,38	1,47
	6,0	69,41	1,47
	24,0	70,11	1,47 e 1,84
	48,0	10,05	1,50
Ácida	0	100,92	1,47 e 1,93
	0,25	99,47	1,47 e 1,93
	0,50	98,95	1,47 e 1,93
	1,5	87,98	1,47 e 1,93
	3,0	80,92	1,47 e 1,93
	6,0	79,77	1,47 e 1,93
	24,0	79,57	1,47 e 1,93
	48,0	56,64	1,47
Aquosa	0	100,00	1,47
	0,25	100,52	1,47
	0,50	103,38	1,47
	1,5	100,49	1,47
	3,0	98,84	1,47
	6,0	82,75	1,47
	24,0	58,52	1,47
	48,0	47,68	1,47
Oxidativa	0	100,00	1,47 e 1,93
	0,25	99,69	1,47 e 1,93
	0,50	77,02	1,47 e 1,93
	1,5	72,52	1,47 e 1,93
	3,0	60,89	1,47 e 1,93
	6,0	48,91	1,47 e 1,93
	24,0	54,35	1,47 e 1,93
	48,0	29,35	1,47 e 1,93
Fotolítica	0	100,00	1,47
	0,25	99,54	1,47
	0,50	103,89	1,47
	1,5	104,07	1,47
	3,0	105,70	1,47
	6,0	96,46	1,47
	24,0	95,02	1,47
	48,0	91,82	1,47
	7 dias	86,01	1,47

Figura 33- Eletroferogramas da amostra de daptomicina em pó para solução injetável (100 µg/mL) submetida à degradação em: a) meio alcalino (NaOH 0,001 M) a 60 °C após 1,5 h; b) meio ácido (HCl 0,01 M) a 60 °C após 1,5 h; c) meio aquoso (H₂O) a 60 °C após 6 h; d) meio oxidativo (H₂O₂ 0,3%) a 60 °C após 0,5 h; e) meio fotolítico (luz UVC) após 7 dias. Eletrólito: tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM; tensão: 15 kV; capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 21 cm. DPT: daptomicina. IMP: impureza. DEG: produto de degradação. H₂O₂: pico gerado pelo peróxido de hidrogênio.



Em relação aos eletroferogramas apresentados na Figura 33, foram realizadas análises dos picos da daptomicina para verificar a sua pureza e se há interferência de algum produto de degradação. A pureza detectada em todos os casos foi superior a 99,80%.

6.4.4.2.6. LD e LQ

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados para determinar a sensibilidade do método. O valor estimado para o limite de detecção foi de 16,17 µg/mL e para o limite de quantificação de 49,01 µg/mL.

6.4.4.2.7. Teste de conformidade do sistema eletroforético

O teste de conformidade do sistema eletroforético foi realizado em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de eletroforese capilar e os resultados obtidos estão descritos no item 5.4.4.1 (Tabela 12).

6.4.5. Discussão

A eletroforese capilar é uma técnica cada vez mais utilizada na atualidade e isto é decorrente de vários fatores. Um deles é sua simplicidade instrumental, já que consiste basicamente em dois reservatórios para eletrólitos, preenchidos geralmente por uma solução tamponante, o capilar (onde ocorre a migração), uma fonte de alta tensão e um detector posicionado em linha (SANTOS; TAVARES; RUBIM, 2000). A detecção pode ser obtida *on-line* (por UV/DAD, fluorescência ou detectores eletroquímicos) ou através de detectores externos (espectrômetro de massas) (SUNTORNUSUK, 2010). O mais comum, no entanto, é o detector UV/DAD, tal qual foi utilizado neste trabalho.

Outro fator que contribui com o rápido avanço da eletroforese capilar é a variedade dos modos de separação que podem ser efetuados em uma única coluna capilar e da diversidade dos compostos passíveis de análise em cada modo (TAVARES, 1997). Desde moléculas pequenas e simples, orgânicas e inorgânicas, até moléculas complexas podem ser analisadas por esta técnica. Isto torna a eletroforese capilar uma ferramenta promissora para diversas áreas do conhecimento (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

Além disso, as análises efetuadas geralmente são rápidas, o que permite a análise de centenas de amostras em um único dia, com uma alta eficiência de separação. Ao mesmo tempo, o baixo volume de amostra e reagentes necessários para as análises faz com que o custo por teste seja baixo, outra vantagem do método (CREAMER; OBORNY; LUNTE, 2014). Pelo mesmo motivo, a eletroforese capilar é considerada um método ambientalmente favorável, já que o solvente mais utilizado é a água, e sempre em volumes muito pequenos

(poucos mililitros), o que traz vantagens para o meio ambiente e operadores (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

Na literatura, até hoje, não existem trabalhos publicados descrevendo o desenvolvimento e validação de método de eletroforese capilar para análise da daptomicina em qualquer matriz, seja material biológico ou produto farmacêutico. Desta forma, o objetivo desta etapa do trabalho foi desenvolver um método quantitativo para análise da daptomicina em pó liofilizado para solução injetável por meio de eletroforese capilar.

Os ensaios preliminares para o desenvolvimento do método de eletroforese capilar foram descritos e discutidos anteriormente, durante o desenvolvimento do método qualitativo (item 5.4.5). Assim, tampão fosfato de potássio pH 7,0 15 mM foi escolhido o eletrólito de corrida, sob uma tensão de 15 kV e capilar de sílica fundida, não revestido, com diâmetro interno de 50 μm e comprimento total de 21 cm.

O teste de conformidade do sistema (Tabela 12, seção 5.6.4.1) mostrou que os parâmetros escolhidos para o método são capazes de fornecer resultados com precisão e exatidão confiáveis, visto que o número de pratos foi superior a 2000, dentro do recomendado, e os valores médios dos fatores de assimetria e de cauda estiveram abaixo do valor-limite de 2,0 (FDA, 1994). Foi verificado também que os valores de DPR% para altura do pico e tempo de migração da daptomicina durante o teste de adequabilidade do sistema foram $\leq 2,0\%$, considerados adequados.

O tempo de migração obtido foi de 1,73 minutos, em média. Considerando o alto peso molecular da daptomicina, trata-se de um adequado tempo de migração.

A linearidade do método foi constatada no intervalo de 50,0 a 175,0 $\mu\text{g/mL}$. Os valores para o intercepto e a inclinação da curva analítica foram 3071,6 e 100,61, respectivamente, com coeficiente de correlação de 0,9987, o que mostra a adequada linearidade do método. A análise estatística (Tabela 43) mostrou que o método apresentou regressão linear significativa, visto que o valor de F calculado (1472,49) foi superior ao de F tabelado (4,75) para este quesito. Além disso, a análise estatística mostrou que não houve desvio significativo da linearidade, já que o F calculado (0,00) foi menor que o F tabelado (3,26). Esta análise foi realizada a um nível de significância de 5%.

O método apresentou precisão adequada, visto que os valores de DPR% para os parâmetros intradia, interdias e entre-analistas foram 1,50%, 2,17% e 0,51%, respectivamente, os quais se encontram abaixo de 5,0%, que é recomendado (BRASIL, 2003). O método

também mostrou exatidão apropriada, visto que apresentou valor experimental médio de recuperação de 100,14%, como mostra a Tabela 45.

A robustez do método foi comprovada por meio do modelo de Plackett-Burman (Tabela 46). Através deste ensaio, foi verificado que nenhuma alteração realizada nos parâmetros de trabalho foi considerada significativa em comparação com os valores de referência calculados durante a execução do teste. Isto mostrou que pequenas alterações no comprimento de onda, na temperatura do cartucho, na tensão aplicada, nos tempos de lavagem do capilar com NaOH 0,1 M, água e eletrólito de corrida e na concentração do eletrólito de corrida são permitidas sem que ocorram mudanças significativas no resultado final fornecido pelo método.

A seletividade do método foi demonstrada quanto à interferência do excipiente na análise da daptomicina e quanto à interferência de produtos de degradação formados após a amostra ser submetida a condições forçadas de degradação. Em ambos os casos não houve nenhuma interferência, comprovando a seletividade do método. Uma análise da pureza dos picos de daptomicina após degradação e também na presença do excipiente reforçou este fato, já que o pico de daptomicina mostrou-se puro (pureza superior a 99,8%) em todos os casos.

Assim como o discutido durante o desenvolvimento do método de CLAE, o estudo de degradação forçada de fármacos é muito importante, tanto para demonstrar a capacidade indicativa de estabilidade do método quanto para desvendar o comportamento desta substância quando submetida a diferentes condições de pH e temperatura (BLESSY et al., 2013).

Assim sendo, a amostra de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável foi submetida a condições forçadas de degradação em meios ácido, alcalino, aquoso, oxidativo e fotolítico. Houve decréscimo do pico de daptomicina em todas as condições de estresse as quais a amostra foi submetida, demonstrando sua provável degradação. No entanto, a daptomicina mostrou-se mais estável em condição fotolítica, na qual a amostra degradou por volta de 14% após 7 dias de exposição à luz UV. Por outro lado, a amostra demonstrou ser menos estável em condição alcalina, na qual após 30 minutos de exposição, a degradação já era de 14,20% e após 48 horas, de quase 90%. Estes resultados corroboram com os obtidos no estudo de degradação forçada da amostra de daptomicina durante o desenvolvimento do método de CLAE, descrito anteriormente neste trabalho. Além disso, existem dados na literatura que mostram a instabilidade da daptomicina em condições alcalinas (MUANGSIRI; KIRSCH, 2001; CHRIST et al., 2012).

Para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, alguns autores defendem que uma degradação na faixa de 5 a 20% é aceitável, sendo que uma degradação superior a esta pode gerar produtos de degradação secundários, os quais não são produtos de interesse por não serem realísticos (ALSANTE et al., 2007; BLESSY et al., 2013). A legislação brasileira aceita uma degradação na faixa de 10 a 30% para o mesmo propósito (BRASIL, 2012). No entanto, não há uma regra clara para isso.

Considerando uma degradação de 10-30%, a Figura 33 apresenta os eletroferogramas obtidos após as degradações ácida, alcalina, aquosa, oxidativa e fotolítica. Analisando-se os eletroferogramas, percebe-se que em todos os casos um pico em 1,47 minutos está presente. Quando observamos os eletroferogramas obtidos com a daptomicina SQR e amostra (Figuras 17 e 18, seção 5.6.4.2) sem qualquer degradação, o mesmo pico está presente em ambos os casos. Provavelmente não se trata de um produto de degradação, mas sim de alguma impureza. Este pico se encontra bem separado do pico principal da daptomicina, portanto não interfere na sua análise.

Já nos eletroferogramas obtidos nas condições ácida e oxidativa, novos picos surgiram, indicando prováveis produtos de degradação. No eletroferograma obtido na condição ácida, o pico principal da daptomicina se encontra distorcido (não está simétrico), no entanto, análise constatou 100% de pureza deste pico. Portanto, não há nenhum produto de degradação coeluinto com o mesmo. Esta distorção ocorreu, provavelmente, devido ao preparo da solução em HCl 0,01 M.

Nas condições alcalina, aquosa e fotolítica não houve o surgimento de picos extras nos eletroferogramas, embora a área do pico principal da daptomicina já tenha indicado uma degradação na faixa recomendada. Existem algumas explicações para este fato, tais como: o produto de degradação pode ter apresentado eluição tardia nas condições propostas e por tal motivo não ter aparecido no tempo de corrida estabelecido (3 minutos); ele pode ter se ligado fortemente no interior do capilar não sendo arrastado pelo eletrólito de corrida; pode não apresentar um cromóforo; pode ser altamente volátil; entre outros (TEMPLETON; PADEIRO, 2014). Os produtos de degradação que surgiram estão bem separados do pico principal.

Nota-se que alguns produtos de degradação observados no estudo de degradação forçada da daptomicina pelo método de CLAE, desenvolvido em etapa anterior neste trabalho, não foram observados aqui, e o oposto também é verdadeiro. Uma explicação para isso pode

ser a utilização de diferentes comprimentos de onda para detecção no UV. Na CLAE foi utilizado um comprimento de onda de 221 nm e na eletroforese capilar de 200 nm.

O método proposto cumpre todos os requisitos preconizados pela literatura para validação de um método de eletroforese capilar indicativo de estabilidade, sendo capaz de quantificar daptomicina em pó liofilizado para solução injetável, além de ser capaz de avaliar sua estabilidade, podendo ser uma alternativa econômica, rápida, segura para os operadores e ambientalmente favorável para análises de rotina do controle de qualidade deste fármaco.

6.5. Espectrofotometria na região do infravermelho médio

6.5.1. Considerações gerais

Quase todas as moléculas que possuem ligações covalentes são capazes de absorver várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho. Uma das regiões mais importantes do infravermelho é a vibracional ou do infravermelho médio (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2010).

A radiação no infravermelho vibracional, normalmente, é mencionada como “número de onda (cm^{-1})” em vez de “comprimento de onda (μm)”, principalmente pelo fato de o número de onda ser diretamente proporcional ao nível de energia de vibração. Quanto maior a energia vibracional, maior será o número de onda. Desta forma, em termos de número de onda, a faixa do infravermelho médio (ou vibracional) no espectro eletromagnético vai de 400 a 4000 cm^{-1} , a qual corresponde a comprimentos de onda de 2,5 a 25 μm . Nesta faixa, a radiação infravermelha, quando absorvida por uma molécula orgânica, converte-se em energia de vibração molecular, sendo que este processo de absorção é quantizado (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; PAVIA et al., 2010).

Os átomos que constituem as ligações químicas de uma molécula não estão estáticos, eles estão sempre em constante movimento ao longo das ligações, resultando em frequências vibracionais naturais. Cada tipo de ligação química possui sua própria frequência natural de vibração. Assim, uma molécula absorve apenas frequências selecionadas de radiação infravermelha, as quais correspondem às suas frequências vibracionais naturais. A energia, quando absorvida, provoca um aumento na amplitude dos movimentos vibracionais das ligações químicas na molécula. No entanto, nem todas as ligações químicas de uma molécula são capazes de absorver radiação infravermelha, apenas aquelas que apresentam uma variação

no seu momento dipolar durante esta vibração. Deste modo, a frequência das vibrações pode estar associada a um determinado tipo de banda (PAVIA et al., 2010).

A radiação na região do infravermelho não possui energia suficiente para promover transições eletrônicas, deste modo, só provoca transições de energia vibracional, as quais compreendem estiramentos e tensionamentos de ligações interatômicas e modificações de ângulos de ligações (FB, 2010).

O equipamento utilizado para se obter os espectros de absorção no infravermelho é chamado de espectrofotômetro de infravermelho. Existem dois tipos, os dispersivos e de transformada de Fourier (FT), sendo que o segundo produz o espectro muito mais rapidamente que o primeiro.

Nos espectrofotômetros dispersivos, a amostra é submetida a um feixe de luz monocromático, que tem sua frequência variada com o tempo para obter-se os dados. Através deste instrumento se obtém um espectro no domínio da frequência (intensidade *versus* frequência), assim como os químicos preferem. Já nos espectrofotômetros de transformada de Fourier, todos os comprimentos de onda são medidos de uma só vez, sendo eles os mais utilizados na atualidade. Este equipamento gera um interferograma, que é um gráfico de intensidade *versus* tempo, chamado espectro no domínio temporal. Para se obter um espectro no domínio da frequência (intensidade *versus* frequência), assim como os instrumentos dispersivos, uma operação matemática, conhecida como transformada de Fourier, é aplicada pelo próprio equipamento. Este tipo de equipamento é mais rápido e mais sensível que o primeiro (JEFFERY et al., 1992; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; FB, 2010; PAVIA et al., 2010).

A espectrofotometria na região do infravermelho médio é considerada um método de excelência para identificação de compostos (FB, 2010). No entanto, cada vez mais vem sendo utilizada também para a quantificação de substâncias (GARRIGUES; GALLIGNANI, DE LA GUARDIA, 1993; MATKOVIC et al., 2004; FAROUK; MOUSSA; AZZAZY, 2011; SHERAZI; ALI; MAHESAR, 2011; MORENO; SALGADO, 2012; TÓTOLI; SALGADO, 2012; VIEIRA; SALGADO, 2012; KOGAWA; SALGADO, 2013; CORRÊA; SALGADO, 2014; PIAVAVINI et al., 2014; KOGAWA; SALGADO, 2015; MALLAH et al., 2015; NATORI; TÓTOLI; SALGADO, 2016), já que as vantagens deste método estão cada vez mais em evidência.

Este método se destaca quando comparado a outros métodos físico-químicos, principalmente por não utilizar solventes orgânicos em suas análises. Desta maneira, não gera

resíduos deste tipo, diminuindo os impactos das atividades da indústria sobre o meio ambiente e reduzindo a quantidade de efluentes a serem tratados por ela, trazendo benefícios ambientais e econômicos (TÓTOLI; SALGADO, 2012). Além disso, é uma técnica ideal para fármacos com problemas de solubilidade, visto que podem ser analisados na forma sólida, em pastilhas de brometo de potássio. Ao mesmo tempo, não é necessário o estágio de extração da amostra, trazendo agilidade para análises de rotina e reduzindo custos com solventes e membranas (MORENO; SALGADO, 2012).

Assim, o objetivo do trabalho foi propor um método analítico para quantificação da daptomicina em pó liofilizado para solução injetável por espectrofotometria na região do infravermelho médio com transformada de Fourier. Assim, esta técnica poderá ser utilizada como opção econômica e ecologicamente favorável para análises de rotina deste fármaco no controle de qualidade.

6.5.2. Material

A daptomicina SQR e amostra de pó liofilizado para solução injetável utilizadas foram descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. Hidróxido de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foi empregado para avaliar a seletividade do método. Para a confecção das pastilhas, foi utilizado brometo de potássio (KBr) de grau analítico da marca Synth (Diadema, Brasil). Antes de sua utilização o KBr foi dessecado a 105 °C em estufa Quimis (Diadema, Brasil) modelo 702.780.

O equipamento de infravermelho empregado foi Shimadzu (Kyoto, Japão), com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21, que permite a digitalização de espectros e a obtenção de arquivos eletrônicos das análises. A região espectral compreendida na análise foi de 1700 a 1600 cm^{-1} (Figura 21, seção 5.7.4), a qual abrange a banda de uma das carbonilas das amidas presentes na molécula de daptomicina. A altura desta banda foi avaliada em termos de absorvância.

O *software Microsoft Excel* (2013) foi utilizado para a construção da curva analítica.

6.5.3. Método

6.5.3.1. Ensaios preliminares

Ensaios preliminares foram realizados durante o desenvolvimento do método qualitativo de espectrofotometria na região do infravermelho médio (item 5.7 deste trabalho)

para selecionar a melhor faixa espectral para análise quantitativa, em que não houvesse nenhuma interferência do adjuvante presente na forma farmacêutica de pó liofilizado. A maneira que a seleção foi realizada está descrita detalhadamente no item 5.7.3.3 deste trabalho.

Além disso, várias concentrações de daptomicina, na faixa de 0,20 a 3,5 mg/150 mg, foram testadas, para se chegar nas melhores concentrações de trabalho.

6.5.3.2. Obtenção da curva analítica

Primeiramente, uma diluição de 1:100 (p/p) de daptomicina SQR em KBr foi realizada, para minimizar erros de pesagem. Para isso, foi pesado o equivalente a 20,0 mg de daptomicina SQR, o qual foi misturado a 1980,0 mg de KBr. Os pós foram misturados geometricamente em gral de ágata até a obtenção de uma mistura homogênea. Depois disso, esta diluição foi levada à estufa a 105 °C por 10 minutos. Após este período, a diluição foi levada à dessecador até atingir temperatura ambiente.

A partir desta diluição, foram pesados 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0 mg (os quais representam 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mg de daptomicina) e depois homogeneizados com quantidade suficiente de KBr para a obtenção de pastilhas de leitura com massa total de 150 mg. Os pós foram misturados e moídos em gral de ágata até a obtenção de uma mistura homogênea. Depois disso, estas misturas foram comprimidas em uma prensa mecânica por 10 minutos para obtenção de pastilhas translúcidas, nas concentrações de 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mg/150 mg, as quais foram analisadas no espectrofotômetro de infravermelho.

Cada concentração foi preparada em triplicata e as leituras foram realizadas em absorvância, na faixa espectral compreendida entre 1700 e 1600 cm^{-1} . A curva analítica foi construída, com auxílio do *software Microsoft Excel* (2013), através da disposição das concentrações de trabalho das pastilhas de daptomicina SQR em relação às respectivas médias das absorvâncias obtidas para cada uma delas. Este procedimento foi realizado três dias diferentes e uma curva analítica final com a média dos três dias foi construída.

6.5.3.3. Determinação da daptomicina no medicamento

6.5.3.3.1. Preparo das pastilhas de daptomicina SQR

Foram preparadas pastilhas de KBr contendo daptomicina SQR na concentração de 0,4 mg/150 mg. Primeiramente, uma diluição de 1:100 (p/p) de daptomicina SQR em KBr foi

realizada, assim como o descrito no item 6.5.3.1, para minimizar erros de pesagem. A partir desta diluição, 40 mg foram pesados (os quais representam 0,4 mg de daptomicina) e depois homogeneizados com 110 mg de KBr, para se obter uma pastilha com massa total de 150 mg. Os pós foram misturados e moídos em gral de ágata até a obtenção de uma mistura homogênea. Depois disso, esta mistura foi comprimida em uma prensa mecânica por 10 minutos para obtenção de uma pastilha translúcida, a qual foi analisada no espectrofotômetro de infravermelho. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância.

6.5.3.3.2. Preparo das pastilhas de daptomicina amostra

Foram preparadas pastilhas de KBr contendo daptomicina na concentração de 0,4 mg/150 mg. Para isso, primeiramente foi verificado o peso médio de três frascos-ampola de daptomicina (descritos no item 4.3) e preparado um *pool* de amostras, conforme descrito no item 5.3.2.1.3.1. A partir deste *pool*, foi realizada uma diluição de 1:100 (p/p) de daptomicina em KBr, assim como o descrito no item 6.5.3.1, para minimizar erros de pesagem.

A partir desta diluição, 40 mg foram pesados (os quais representam 0,4 mg de daptomicina) e depois homogeneizados com 110 mg de KBr, para se obter uma pastilha com massa total de 150 mg. Os pós foram misturados e moídos em gral de ágata até a obtenção de uma mistura homogênea. Depois disso, esta mistura foi comprimida em uma prensa mecânica por 10 minutos para obtenção de uma pastilha translúcida, a qual foi analisada no espectrofotômetro de infravermelho. As determinações foram realizadas em triplicata e as leituras em absorvância.

6.5.3.3.3. Cálculo do teor de daptomicina na amostra

A concentração de daptomicina na amostra foi calculada pela Equação 7 e o seu teor percentual foi calculado pela Equação 8. Estas equações foram descritas anteriormente no item 6.1.3.3.3 deste trabalho. Obs: neste caso, a unidade usada foi de mg/150 mg (ou mg/pastilha) ao invés de $\mu\text{g/mL}$, como descrito no item mencionado.

6.5.3.4. Validação do método

O método foi validado pela determinação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, robustez, seletividade e limites de detecção e de quantificação, de acordo com o preconizado pela literatura (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 37, 2014).

6.5.3.4.1. Linearidade

Para a análise da linearidade do método, foram avaliadas três curvas analíticas, realizadas em três dias diferentes. Cada curva foi construída de acordo com o descrito no item 6.5.3.1. Os resultados obtidos foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada por análise de variância (ANOVA).

6.5.3.4.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois quesitos: a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade (intradia) foi estudada através da análise de seis pastilhas de daptomicina SQR na concentração de 0,4 mg/150 mg, no mesmo dia e em condições de trabalho idênticas. O valor do desvio padrão relativo percentual (DPR%) entre as determinações foi avaliado. A precisão intermediária (interdias e entre-analistas), por sua vez, foi avaliada através da realização de determinações do teor de daptomicina na amostra de pó para solução injetável em três dias diferentes e também por um segundo analista, sob as mesmas condições experimentais. Os valores de DPR% entre os doseamentos foram calculados (ICH, 2005).

6.5.3.4.3. Exatidão

A exatidão do método foi realizada através do ensaio de recuperação, no qual quantidades conhecidas de daptomicina SQR foram adicionadas a quantidades conhecidas de amostra (ICH, 2005). A recuperação foi realizada em três níveis, R1, R2 e R3, e as pastilhas foram preparadas segundo a Tabela 48, em triplicata.

Tabela 48- Preparo das soluções para o teste de recuperação do método de espectrofotometria na região do infravermelho médio

	Daptomicina amostra (diluição 1:100, p/p em KBr) (mg)	Daptomicina SQR (diluição 1:100, p/p em KBr) (mg)	Quantidade de KBr (mg) ¹	Concentração teórica final (mg/150 mg) ²
Amostra	20,0	-	130,0	0,20
R1	20,0	12,0	118,0	0,32
R2	20,0	20,0	110,0	0,40
R3	20,0	28,0	102,0	0,48
Padrão	-	20,0	130,0	0,20

¹ Quantidade suficiente para o preparo de pastilhas com massa total de 150 mg

² Cada nível de concentração foi preparado em triplicata

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada pela Equação 9, determinada pela AOAC (AOAC, 2002) e descrita na seção 6.1.3.4.3 deste trabalho. Obs: neste caso, a unidade usada foi de mg/150 mg (ou mg/pastilha) ao invés de µg/mL, como descrito no item mencionado.

6.5.3.4.4. Robustez

Para a avaliação da robustez do método, os seguintes parâmetros foram variados individualmente: força de compressão das pastilhas na prensa mecânica (5 kN acima e abaixo da pressão de trabalho) e marca do brometo de potássio (Shimadzu, Kyoto, Japão). Para isso, foram realizados doseamentos de daptomicina na amostra de pó para solução injetável nas diferentes condições propostas. As respostas obtidas foram avaliadas quanto ao DPR% entre as determinações, comparando-as com as condições normais de trabalho.

6.5.3.4.5. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de espectrofotometria na região do infravermelho médio e o método está descrito no item 5.7.3.3.

6.5.3.4.6. LD e LQ

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados pelas Equações 10 e 11, respectivamente, descritas no item 6.1.3.4.6, com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva (ICH, 2005).

6.5.4. Resultados

6.5.4.1. Ensaios preliminares

Os ensaios preliminares foram realizados em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de espectrofotometria na região do infravermelho médio e os resultados estão descritos na seção 5.7.4.

Além disso, as melhores concentrações para a construção da curva analítica foram observadas na faixa de 0,2 a 0,6 mg/150 mg.

6.5.4.2. Validação do método

6.5.4.2.1. Linearidade

Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de daptomicina SQR para a construção da curva analítica estão apresentados na Tabela 49.

Tabela 49- Valores de absorvância determinados para a curva analítica de daptomicina SQR pelo método de espectrofotometria na região do infravermelho médio (1700-1600 cm^{-1})

Concentração (mg/150 mg)	Absorvância ¹	Absorvância média $\pm$ DP ²	DPR ³ (%)
0,20	0,292	0,295 $\pm$ 0,0007	2,37
	0,290		
	0,303		
0,30	0,427	0,443 $\pm$ 0,0146	3,31
	0,456		
	0,445		
0,40	0,584	0,596 $\pm$ 0,0012	2,01
	0,608		
	0,556		
0,50	0,724	0,734 $\pm$ 0,0117	1,59
	0,747		
	0,732		
0,60	0,879	0,890 $\pm$ 0,0098	1,11
	0,893		
	0,898		

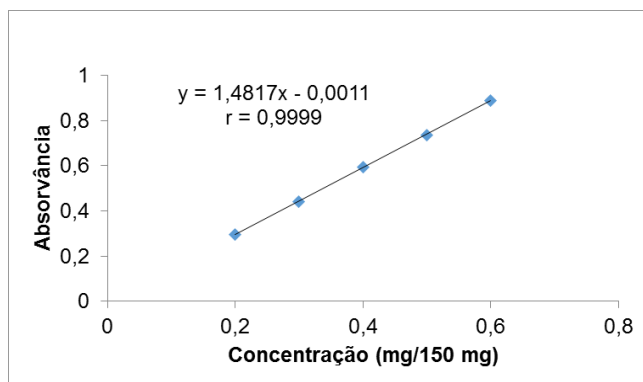
¹ Valor médio de três determinações

² DP: desvio padrão

³ DPR: desvio padrão relativo

A curva analítica de daptomicina SQR (Figura 34) foi construída com a disposição do valor médio das absorvâncias em relação às suas respectivas concentrações.

Figura 34- Curva analítica de daptomicina SQR, obtida pelo método de espectrofotometria na região do infravermelho médio (1700-1600 cm^{-1}).



A ANOVA calculada para os dados da curva analítica de daptomicina SQR está apresentada na Tabela 50.

Tabela 50- Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção da curva analítica de daptomicina SQR, utilizando o método de espectrofotometria na região do infravermelho médio (1700-1600 cm^{-1})

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	4	0,658762	0,164691	1285,31*	3,48
Regressão linear	1	0,658530	0,658530	5139,41*	4,96
Desvio da linearidade	3	0,000233	0,000078	0,61	3,71
Resíduo	10	0,001281	0,000128	-	-
Total	14	0,660044	-	-	-

*Significativo para $p < 0,05$

6.5.4.2.2. Precisão

A precisão do método foi avaliada em três parâmetros: intradia, interdias e entre-analistas. Os resultados foram expressos com base nos valores de DPR percentuais. A

precisão intradia forneceu um valor de DPR de 2,12%. Os valores percentuais de DPR apresentados pelos parâmetros interdias e entre-analistas estão apresentados na Tabela 51.

Tabela 51- Determinação da precisão interdias e entre-analistas do método de espectrofotometria na região do infravermelho médio (1700-1600 cm^{-1}) para análise de daptomicina em pó liofilizado

Amostra	Dia	Interdias			Analista	Entre-analistas		
		Massa ¹ (g/frasco)	Teor ¹ (%)	DPR ² (%)		Massa ¹ (g/frasco)	Teor ¹ (%)	DPR ² (%)
1	1	0,507	101,49	1,03	1	0,499	99,75	1,58
	2	0,499	99,99					
	3	0,510	102,00		2	0,510	102,00	

¹ média de três determinações

² DPR = desvio padrão relativo

6.5.4.2.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, o qual foi realizado em três níveis de concentração e os resultados estão apresentados na Tabela 52.

Tabela 52- Determinação da exatidão do método analítico para análise de daptomicina por espectrofotometria na região do infravermelho médio (1700-1600 cm^{-1})

	Daptomicina SQR adicionada (mg/150 mg)	Daptomicina SQR encontrada ¹ (mg/150 mg)	Recuperação (%)	DPR ² (%)	Recuperação média (%)
R1	0,120	0,123	102,40	0,34	100,34
R2	0,200	0,199	99,28	1,47	
R3	0,280	0,278	99,33	1,17	

¹ média de três determinações

² DPR = desvio padrão relativo (dentro de cada nível de recuperação)

6.5.4.2.4. Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio de pequenas modificações, individuais, nos seguintes parâmetros de trabalho: força de compressão das pastilhas na prensa mecânica e marca do brometo de potássio. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 53.

Tabela 53- Avaliação da robustez do método analítico para análise de daptomicina por espectrofotometria na região do infravermelho médio (1700-1600 cm⁻¹)

Variável	Faixa investigada	Teor (g/frasco)	Teor (%)	DPR ¹ (%)
Força de compressão	75 kN	0,491	98,12	1,14
	80 kN ²	0,499	99,99	
	85 kN	0,502	100,38	
Marca do KBr	Synth ²	0,499	99,99	1,33
	Shimadzu	0,491	98,13	

¹ DPR = desvio padrão relativo

² Parâmetros normais de trabalho

6.5.4.2.5. Seletividade

A seletividade do método quanto à interferência do excipiente foi avaliada em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento de método qualitativo de espectrofotometria na região do infravermelho médio. Os resultados estão descritos no item 5.7.4 e nas Figuras 20 e 21.

6.5.4.2.6. LD e LQ

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados para determinar a sensibilidade do método. O valor estimado para o limite de detecção foi de 0,0072 mg/150 mg e para o limite de quantificação de 0,0219 mg/150 mg.

6.5.5. Discussão

A substituição de métodos que demandam o uso de grandes volumes de solventes orgânicos por métodos verdes para análises de rotina em indústrias farmacêuticas é uma prática cada vez mais comum (SANSEVERINO, 2000, NOLASCO; TAVARES; BENDASSOLLI, 2006; GUARDIA; ARMENTA, 2012). Neste contexto, a espectrofotometria na região do infravermelho se destaca, pois se trata de um método que não usa solventes orgânicos para suas análises e, por tal motivo, não gera resíduos tóxicos no meio ambiente.

Além disso, a espectrofotometria no infravermelho médio se sobressai por se tratar de um método rápido, o qual requer o mínimo ou nenhum pré-tratamento da amostra, fornecer

precisão comparável a outros métodos analíticos e ainda auxiliar na detecção de falsificação e impurezas (FAROUK; MOUSSA; AZZAZY, 2011).

A espectrofotometria no infravermelho médio, apesar de ser uma técnica utilizada tipicamente para auxiliar na identificação de substâncias, vem sendo cada vez mais utilizada para a análise quantitativa de compostos. Há algumas décadas isto não era viável, principalmente pelo fato dos espectrofotômetros dispersivos, os quais eram os únicos disponíveis no mercado, demandarem muito tempo para a obtenção de um espectro. No entanto, com a chegada no mercado dos espectrofotômetros de transformada de Fourier, a quantificação de compostos se tornou viável, pois este equipamento apresenta maior velocidade e sensibilidade que um instrumento dispersivo (PAVIA et al., 2010).

Considerando todas as vantagens que este método oferece, esta etapa do trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de método quantitativo para análise de daptomicina em pó liofilizado, por meio de espectrofotometria na região do infravermelho médio. Durante o desenvolvimento do método, um espectro de daptomicina SQR foi comparado ao espectro de hidróxido de sódio (Figura 21), que é o único adjuvante presente na forma farmacêutica de pó liofilizado, para a seleção da melhor faixa espectral a ser utilizada na análise quantitativa. O objetivo foi a seleção de uma faixa espectral em que não houvesse a interferência do adjuvante. Assim, a faixa de 1700 a 1600 cm^{-1} foi escolhida, a qual abrange a banda de uma das carbonilas das amidas presentes na molécula de daptomicina. Com este ensaio, a seletividade do método também foi comprovada.

As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de brometo de potássio contendo o fármaco. O brometo de potássio, sob alta pressão, funde-se e inclui o fármaco em uma matriz, resultando em uma pastilha que é analisada em etapa posterior. Esta forma do preparo de amostras mostra a vantagem de ser adequada para fármacos com problemas de solubilidade, já que são utilizados na forma sólida para a confecção das pastilhas, sem a necessidade de nenhum pré-tratamento, como mencionado anteriormente. No entanto, a desvantagem é o fato de que o brometo de potássio é altamente higroscópico, e a água absorvida por ele pode interferir no espectro obtido (PAVIA et al., 2010). Por tal motivo, um rígido controle da umidade do local das análises deve ser efetuado. Durante o desenvolvimento deste trabalho, foi observado que a permanência do ar condicionado ligado (a uma temperatura de aproximadamente 21 °C) auxilia neste controle e é uma medida efetiva para se controlar a umidade do ambiente.

A curva analítica para a daptomicina SQR foi construída pela disposição do valor médio das absorvâncias em relação às suas respectivas concentrações, mostrando linearidade adequada na faixa de 0,2 a 0,6 mg/150 mg (ou mg/pastilha). O coeficiente de correlação apresentado foi de 0,9999, valor muito próximo da unidade, o que mostra a linearidade do método. Ao mesmo tempo, a análise estatística dos resultados (Tabela 50) demonstrou que não há desvio de linearidade significativo, a um nível de significância de 5%, já que o valor de F calculado (0,61) se mostrou inferior ao de F tabelado (3,71) para este quesito.

O método apresentou precisão adequada (Tabela 51), já que os valores de DPR encontrados para os parâmetros intradia, interdias e entre-analistas foram de 2,12%, 1,03% e 1,58%, respectivamente, todos inferiores a 5%, como o recomendado pela RDC nº 899 de 2003 (BRASIL, 2003). A exatidão também se mostrou apropriada, visto que o valor médio de recuperação foi de 100,34% (Tabela 51), muito próximo a 100%.

O método mostrou ser robusto para os parâmetros força de compressão e marca do KBr. Nestes dois casos, pequenas modificações foram realizadas e mesmo assim os resultados se mantiveram estatisticamente equivalentes, como visualizado na Tabela 53, com valores de DPR inferiores a 5%. Isto mostra que pequenas modificações nestes parâmetros de trabalho podem ser realizadas sem que haja interferência na análise da daptomicina.

Quanto aos limites de detecção e de quantificação, os valores obtidos foram de 0,0072 e 0,0219 mg/150 mg, respectivamente. Estes valores mostram a confiabilidade do método para detectar e quantificar a daptomicina em pó para solução injetável.

Assim sendo, o método inovador proposto cumpre com todos os requisitos exigidos para a validação de métodos analíticos (BRASIL, 2003; ICH, 2005) e pode ser utilizado como alternativa ambientalmente favorável para a quantificação da daptomicina em amostras de pó liofilizado para solução injetável.

7. ANÁLISE COMPARATIVA DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PROPOSTOS

A análise comparativa é uma ferramenta utilizada para avaliar se dois ou mais métodos são intercambiáveis para a análise de uma determinada substância. Em outras palavras, esta análise vai mostrar se dois ou mais métodos analíticos são capazes de fornecer, estatisticamente, os mesmos resultados em relação à análise de um composto. Desta maneira, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para verificar se os métodos analíticos desenvolvidos e validados neste trabalho são intercambiáveis para a análise da daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado.

A Tabela 54 apresenta os teores de daptomicina na amostra de pó liofilizado obtidos em cada um dos cinco métodos propostos e a Tabela 55 mostra os resultados da análise de variância realizada entre eles, a um nível de significância de 5%.

Tabela 54- Valores obtidos na determinação do teor de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável utilizando os métodos analíticos propostos

Parâmetros	Método				
	UV ¹	TURBI ²	CLAE ³	EC ⁴	IR ⁵
Teor (%)	101,45	101,78	99,88	102,91	101,49
	102,76	101,17	101,90	102,38	99,99
	99,80	98,94	99,10	98,87	102,00
Teor médio (%)	101,34	100,63	100,29	101,39	101,16
DPR (%)	1,46	1,49	1,44	2,17	1,03

¹ UV: espectrofotometria na região do ultravioleta

² TURBI: ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico

³ CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

⁴ EC: eletroforese capilar

⁵ IR: espectrofotometria na região do infravermelho médio

Tabela 55- Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável pelos métodos analíticos propostos

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado*
Entre grupos	4	2,75	0,69	0,28	3,48
Dentro dos grupos	10	24,87	2,49		
Total	14	27,62			

*Significativo para $p < 5\%$

Como pode ser observado nos resultados da ANOVA, o valor de F calculado (0,28) foi menor que o de F tabelado (3,48). Isto significa que os cinco métodos desenvolvidos e validados neste trabalho fornecem, estatisticamente, os mesmos resultados quanto à quantificação da daptomicina na amostra.

Apesar da intercambialidade dos métodos para este propósito, existem diferenças consideráveis entre eles. A Tabela 56 sintetiza estas características.

Tabela 56- Principais características dos métodos propostos

	UV ¹	TURBI ²	CLAE ³	EC ⁴	IV ⁵
Custo do equipamento	++	+	++++	++++	+++
Custo analítico	+	++	++++	+	+
Uso de solventes orgânicos/ geração de resíduos tóxicos	-	+	++++	-	-
Tempo de execução	+	++	++	+	++
Dificuldade de manuseio/ treinamento	+	++	++	++	++
Possibilidade de automação	Não	Não	Sim	Sim	Não
Separação de produtos de degradação	Não	Não	Sim	Sim	Não

¹ UV: espectrofotometria na região do ultravioleta

² TURBI: ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico

³ CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

⁴ EC: eletroforese capilar

⁵ IR: espectrofotometria na região do infravermelho médio

Obs: Foi atribuído + para o nível mais baixo e ++++ para o mais alto. O símbolo – foi usado quando o método não apresenta determinada característica (igual a zero).

Quanto ao custo do equipamento, entre os cinco métodos desenvolvidos, a CLAE e a eletroforese capilar são aqueles que demandam equipamentos de maior custo. No entanto, comparando as duas técnicas, percebe-se que a eletroforese capilar apresenta diversas vantagens em relação à CLAE. Uma delas é o tempo de análise, que normalmente é menor, o que permite a análise de centenas de amostras em um único dia, com uma alta eficiência de separação. Além disso, a rapidez das análises e a demanda de um volume muito baixo de amostras fazem com que o custo por teste seja baixo (CREAMER; OBORNY; LUNTE, 2014). Outro fator que a eletroforese capilar se destaca em relação à CLAE é em relação ao baixo custo dos capilares, muito menor que de colunas cromatográficas, o que também contribui para o baixo custo das análises. No entanto, a maior desvantagem que o método de

eletroforese capilar apresenta em relação à CLAE é a baixa sensibilidade, a qual é decorrente do caminho ótico reduzido existente nos capilares (MIRANDA; CARRILHO, 2002).

O método de eletroforese capilar desenvolvido neste trabalho não utiliza solventes orgânicos para suas análises e esta é outra vantagem que este método oferece, pois desta maneira não gera este tipo de resíduo. No entanto, apesar de métodos cromatográficos utilizarem volumes relativamente altos de solventes orgânicos para suas análises, o método de CLAE proposto neste trabalho utiliza o etanol como a fase orgânica da fase móvel, o que minimiza os possíveis danos ao meio ambiente e operadores, por se tratar de um solvente orgânico menos tóxico que aqueles mais comumente utilizados para análises cromatográficas, como o metanol e a acetonitrila (RIBEIRO et al., 2004).

Os métodos de espectrofotometria nas regiões do UV e infravermelho também não utilizam solventes orgânicos para suas análises, sendo considerados ambientalmente favoráveis. O método turbidimétrico não utiliza solventes tóxicos, exceto pelo volume muito baixo de formaldeído utilizado para cessar o crescimento das bactérias no final de cada experimento. Por tais motivos, entre os métodos desenvolvidos, a espectrofotometria nas regiões do UV e IR e a eletroforese capilar são aqueles que melhor se enquadram nos parâmetros da Química Analítica Verde.

O método de espectrofotometria na região do infravermelho também possui outras vantagens, entre elas o baixo custo de suas análises, já que o material necessário para a confecção das pastilhas é de custo acessível. No entanto, é uma técnica que demanda maior rigor quanto ao controle de umidade e temperatura do ambiente, além de requerer equipamento de custo relativamente elevado e não haver a possibilidade de automação das análises, como pode ser feito nos métodos de CLAE e eletroforese capilar.

A espectrofotometria na região do UV é considerada simples, rápida, econômica e reprodutível (MORENO; SALGADO, 2009; FIORENTINO; SALGADO, 2012; SILVA; ALMEIDA; SALGADO, 2012; PEDROSO; SALGADO, 2013). O método proposto utiliza apenas água para suas análises, o que torna o custo das análises muito baixo. No entanto, por ser um método de menor especificidade, pode não ser capaz de detectar produtos de degradação e impurezas na matriz analisada, tal como os métodos de CLAE e eletroforese capilar.

O desenvolvimento de métodos microbiológicos é muito importante para a análise de antimicrobianos. Estes métodos fornecem informações importantes quanto à atividade do produto farmacêutico. Alguns estudos mostram que o cálculo do teor do fármaco através da

potência fornece resultados diferentes que quando este é calculado por métodos físico-químicos, o que torna os métodos microbiológicos indispensáveis (MORENO; SALGADO, 2007). Por tal motivo, sempre é recomendável que haja uma combinação entre métodos físico-químicos e microbiológicos para a análise de antimicrobianos, já que são complementares. Neste trabalho, o método microbiológico proposto foi o turbidimétrico. Este método demanda apenas 4 horas para a leitura dos resultados, o que o torna muito vantajoso, já que este tempo é comparável com o de alguns métodos físico-químicos e é consideravelmente inferior ao tempo necessário para o ensaio por difusão em ágar, o qual é sugerido por muitas farmacopeias para a análise de antimicrobianos.

8. ESTUDO DE ESTABILIDADE

8.1. Considerações gerais

Estabilidade pode ser definida como o tempo durante o qual o produto farmacêutico mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía no momento de sua fabricação (SILVA et al., 2009). 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 avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos normalmente é separada em estudos de estabilidade físico-química e microbiológica. O produto deve manter boa aparência, assim, alterações como descoloração ou escurecimento devem ser motivos de desconfiança. Além disso, o teor do ingrediente ativo deve ser assegurado com o tempo (VADAS, 2000). A ocorrência de reações químicas pode resultar na degradação de princípios ativos e adjuvantes. 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).

Na literatura encontram-se guias e diretrizes para a realização de estudos de estabilidade, os quais recomendam a realização de duas etapas: testes acelerados e testes de longa duração. Os estudos acelerados são conduzidos 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, por sua vez, 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).

Existe também outro tipo de estudo de estabilidade, que é por meio da degradação forçada do fármaco ou do produto farmacêutico. A degradação forçada é obtida submetendo-se o fármaco ou produto farmacêutico a condições mais severas que o estudo de estabilidade acelerado. Estudos de degradação forçada mostram o comportamento químico da molécula, o que auxilia no desenvolvimento de formulações e na seleção do melhor material para acondicioná-las (BLESSY et al., 2013).

Estudos de estabilidade, de maneira geral, são aplicados para prever, determinar ou acompanhar o prazo de validade de produtos farmacêuticos. O prazo de validade é o tempo limite que um produto farmacêutico deve ser utilizado, tendo como base os resultados obtidos nos testes de estabilidade acelerado ou de longa duração, sob a condição de que o usuário armazene o produto nas condições especificadas na rotulagem (BRASIL, 2005).

Para se determinar a estabilidade e o prazo de validade de um produto farmacêutico, estudos cinéticos são necessários. Este tipo de estudo avalia a velocidade da degradação e o modo como a velocidade varia em função de diferentes condições, tais como a concentração dos reagentes, adjuvantes e outras substâncias químicas presentes, e fatores como a pressão, luz, umidade e temperatura (PRISTA, 1990).

As reações químicas, normalmente, são classificadas por sua ordem, a qual pode ser definida através da razão pela qual a velocidade de reação (ou degradação) varia com a concentração dos reagentes em função do tempo (ANSEL et al., 2000; LACHMAN et al., 2001). A maior parte dos produtos farmacêuticos segue reações de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem (ANSEL et al., 2000).

Reações de ordem zero são aquelas em que a velocidade da reação química é constante e independente da concentração dos reagentes. A velocidade da reação química pode ser expressa como a taxa com que a concentração do fármaco diminui em função do tempo. Podem ser calculadas pela Equação 19 (LACHMAN et al., 2001).

$$C = C_o - kt \quad \text{Equação 19}$$

Reações de primeira ordem são aquelas nas quais a velocidade da reação química é proporcional à concentração de um reagente. Assim, a concentração de um reagente diminui exponencialmente em função do tempo. São calculadas pela Equação 20 (LACHMAN et al., 2001).

$$\ln C = \ln C_o - kt \quad \text{Equação 20}$$

Reações de segunda ordem são aquelas nas quais a velocidade da reação química é proporcional às concentrações de dois reagentes. Estas reações podem ser calculadas pela Equação 21 (LACHMAN et al., 2001).

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt$$

Equação 21

Para as Equações 19, 20 e 21:

C = concentração no tempo t

C₀ = concentração inicial

k = constante de velocidade da reação

Quando a ordem da reação química é desconhecida, existem várias maneiras para determiná-la. No entanto, o método dos gráficos é o mais utilizado em análises farmacêuticas. Para verificar se a reação química é de ordem zero, plota-se o gráfico da concentração (C) em função do tempo (t). Caso este gráfico dê origem a uma reta, trata-se de uma reação de ordem zero. No caso da reação de primeira ordem, uma reta é obtida ao plotar-se o gráfico do logaritmo da concentração (log C) em função do tempo (t). Para a reação de segunda ordem, uma reta é obtida quando o inverso da concentração (1/C) é plotado em função do tempo (t). No entanto, quando a degradação do fármaco é muito baixa, a determinação da ordem da reação torna-se difícil por este método, pois a tendência é que todos os gráficos se mostrem lineares (LACHMAN et al., 2001; NETZ; ORTEGA, 2002).

A proposta do estudo de estabilidade realizado neste trabalho foi a busca por evidências de como a qualidade da substância ativa ou produto acabado varia com o tempo sob a influência de uma variedade de fatores ambientais pré-estabelecidos. Para isso, três diferentes estudos foram realizados: um estudo de degradação forçada da daptomicina (substância química de referência), um estudo de estabilidade acelerado e um de longa duração (os dois últimos com a daptomicina no produto acabado).

O estudo de degradação forçada da daptomicina SQR foi realizado para avaliar como este princípio ativo se comporta sob condições forçadas de degradação. A daptomicina na forma pura foi escolhida para este estudo para se evitar a interferência do excipiente presente no produto farmacêutico. Além disso, estudo similar (menos extenso) com o produto acabado foi realizado em etapa anterior deste trabalho, durante desenvolvimento de método indicativo de estabilidade por CLAE. As informações obtidas com este estudo podem auxiliar no desenvolvimento de novas formulações e na escolha do melhor material de

acondicionamento. Este estudo foi desenvolvido durante estágio sanduíche na *University of South Australia* (Adelaide, Austrália).

Os estudos de estabilidade acelerado e de longa duração da daptomicina no produto farmacêutico (pó liofilizado) não foram realizados com o objetivo de se buscar a determinação do prazo de validade do produto, pois ele já se encontra no mercado há mais de uma década e este prazo já foi estabelecido. Estes estudos visaram a avaliação do comportamento da amostra quando submetida às condições definidas pela ANVISA, através da RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005), e a sua análise por alguns dos métodos desenvolvidos neste trabalho (físico-químicos e microbiológicos), com atenção à possível formação de produtos de degradação e perda de atividade antimicrobiana.

8.2. Material

Para os estudos de estabilidade, foram utilizadas daptomicina SQR e amostra de pó liofilizado para solução injetável descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente. Apenas para o estudo de degradação forçada, foi utilizada daptomicina SQR (TocopharmTM, Shanghai, China).

Para o estudo de degradação forçada da daptomicina, também foram utilizadas as seguintes substâncias de grau analítico: soluções de HCl 0,1 e 0,01 M, preparadas a partir de solução concentrada de HCl (Scharlau, Barcelona, Espanha); soluções de NaOH 0,1 e 0,001 M, preparadas a partir de NaOH (Chem-Supply, Port Adelaide, Austrália); soluções tamponantes universais (com valores de pH de 2,0 a 8,0), preparadas a partir de ácido cítrico, ácido bórico e ácido fosfórico (Chem-Supply, Port Adelaide, Austrália); e soluções de peróxido de hidrogênio 0,3 e 3,0%, utilizando peróxido de hidrogênio (Chem-Supply, Port Adelaide, Austrália). Etanol grau CLAE (J.T. BakerTM, Mexico) também foi utilizado, assim como água ultrapurificada obtida através de equipamento Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, EUA).

As análises foram realizadas em HPLC Shimadzu[®] (Kyoto, Japan) conectado a detector SPD-20A UV e injetor automático SIL-20A auto sampler. O *software* utilizado foi o LC Solution[®].

Para os estudos de estabilidade acelerado e de longa duração, as análises foram feitas em CLAE, UV e através de método turbidimétrico. Desta maneira, os materiais utilizados estão descritos nas seções referentes a estes métodos (itens 6.1.2, 6.2.2 e 6.3.2, para os métodos de UV, turbidimétrico e CLAE, respectivamente).

No estudo de estabilidade acelerado, as amostras foram mantidas em estufa Quimis (Diadema, Brasil) modelo 702.780; para o estudo de estabilidade de longa duração, as amostras foram mantidas em refrigerador (Electrolux).

8.3. Métodos

8.3.1. Estudo de degradação forçada da daptomicina SQR

Soluções de daptomicina SQR foram preparadas na concentração de 40,0 µg/mL com o diluente apropriado (de acordo com o tipo de degradação, como descrito a seguir) e filtradas antes de cada injeção. Alíquotas diárias destas soluções foram analisadas por sete dias, através do método de CLAE, que foi desenvolvido e validado previamente neste trabalho (item 6.3). Assim, as áreas dos picos obtidas após cada período de degradação foram comparadas com as fornecidas por uma solução de daptomicina SQR recém-preparada (sem passar pelo processo de degradação).

O perfil de degradação da daptomicina foi estudado sob várias condições de estresse, como será descrito a seguir.

- **Degradações ácida, alcalina e aquosa:** Para a degradação ácida, duas soluções de daptomicina SQR foram preparadas, sendo uma delas utilizando HCl 0,1 M como diluente, e a outra HCl 0,01 M. Duas soluções de daptomicina também foram preparadas para a degradação alcalina, sendo que uma delas foi preparada em NaOH 0,1 M e a outra em NaOH 0,001 M. Para a degradação aquosa, a solução de daptomicina SQR foi preparada em água ultrapurificada. Estas soluções foram mantidas em temperatura ambiente por 7 dias.
- **Degradação oxidativa:** Duas soluções de daptomicina SQR foram preparadas, sendo uma delas utilizando H₂O₂ 0,3% como solvente, e a outra H₂O₂ 3%. Estas soluções foram mantidas em temperatura ambiente por 7 dias.
- **Degradação fotolítica:** Daptomicina SQR na forma sólida (pó) foi submetida à luz solar natural, em temperatura ambiente, por 7 dias.
- **Degradação térmica:** Porções de daptomicina SQR na forma sólida (pó) foram mantidas em estufas com temperaturas ajustadas para 40 e 60 °C, por 7 dias.
- **Degradação pH dependente:** quatro soluções de daptomicina SQR foram preparadas em solução tamponante universal com valores de pH ajustados para 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0. Estas soluções foram mantidas em temperatura ambiente por 7 dias.

8.3.2. Estudos de estabilidade acelerado e de longa duração

A daptomicina comercializada encontra-se acondicionada em frascos-ampola, com rolha de borracha (semi-permeável) e tampa de polipropileno do tipo *flip-of*. O fabricante recomenda que o produto deve ser conservado sob refrigeração (2-8 °C). Com base nestes dados, as condições para cada estudo de estabilidade foram estabelecidas, de acordo com a RE nº. 1, de 29 de julho de 2005. A mesma resolução recomenda que o estudo de estabilidade deve ser executado com o produto farmacêutico em sua embalagem primária. Desta forma, seguiu-se esta recomendação para a realização do estudo (BRASIL, 2005).

Para o estudo de estabilidade acelerado, três frascos-ampola contendo daptomicina em pó liofilizado para solução injetável foram mantidos em estufa com temperatura ajustada para $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e umidade relativa (UR) de $60\% \pm 5\%$. A umidade dentro da estufa foi regulada com um frasco contendo água em seu interior e verificada com auxílio de um termo-higrômetro. As amostras foram analisadas nos períodos de 0, 3 e 6 meses (BRASIL, 2005).

Para o estudo de estabilidade de longa duração, sete frascos-ampola contendo daptomicina em pó liofilizado para solução injetável foram mantidos em refrigerador com temperatura ajustada para $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. A UR não foi acompanhada porque a legislação brasileira não faz nenhuma recomendação para este tipo de produto. As amostras foram analisadas nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses (BRASIL, 2005).

Em ambos os estudos, as amostras coletadas foram analisadas por meio de espectrofotometria na região do UV, ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico e cromatografia líquida de alta eficiência, previamente validados neste trabalho (seções 6.1, 6.2 e 6.3, respectivamente).

Além disso, em cada período de análise, em ambos os casos, os teores obtidos com os três diferentes métodos escolhidos foram comparados através do cálculo do DPR entre eles. No final do estudo, uma análise de variância (ANOVA) foi realizada para comparar os teores de daptomicina obtidos durante todo o estudo de estabilidade (acelerado e longa duração, individualmente) e verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre eles, ou seja, se houve degradação.

Ao mesmo tempo, foram avaliadas as características organolépticas dos pós quanto à aparência.

8.4. Resultados

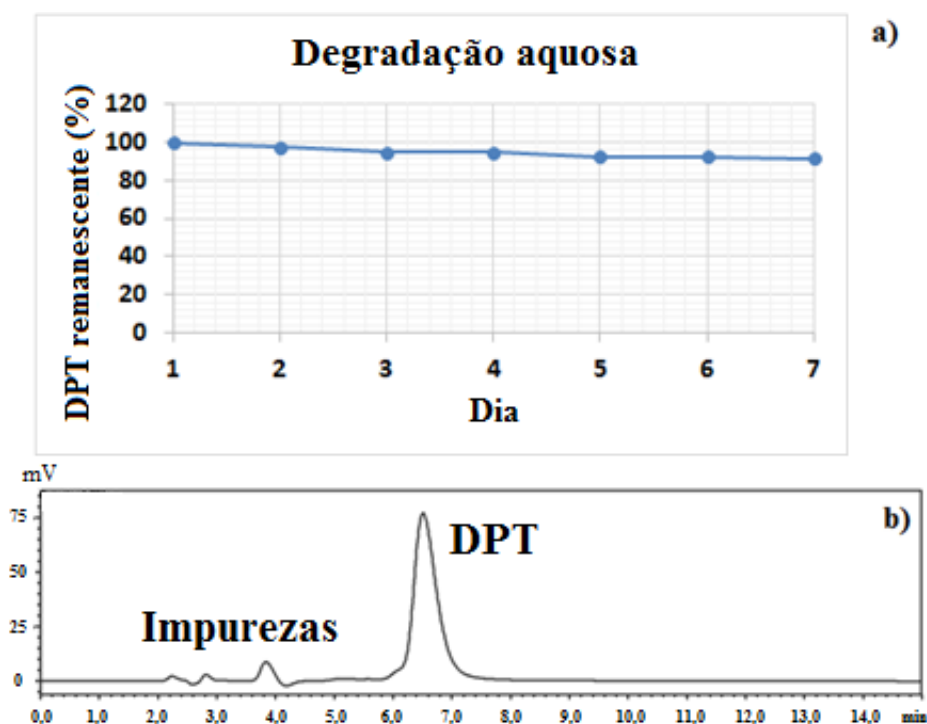
8.4.1. Estudo de degradação forçada da daptomicina

Em todas as condições de estresse, observou-se um decréscimo do pico principal de daptomicina, sugerindo degradação do antimicrobiano. Os resultados serão descritos a seguir.

a) Degradação aquosa

A Figura 35 apresenta a representação gráfica da degradação aquosa da daptomicina SQR e um cromatograma obtido no terceiro dia de degradação, quando a porcentagem de degradação foi de aproximadamente 5%.

Figura 35- a) Representação gráfica da degradação aquosa de daptomicina; b) Cromatograma obtido no terceiro dia da degradação aquosa. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm). DPT: daptomicina.



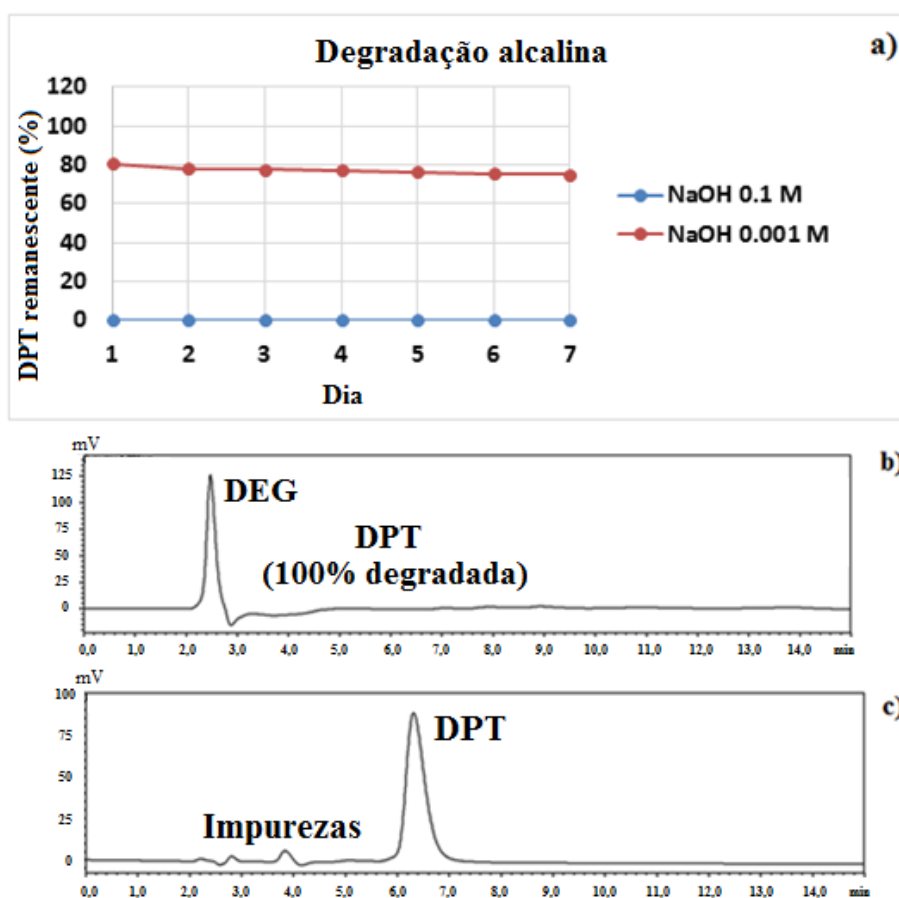
Observação: os picos que apareceram em 2,2; 2,8 e 3,8 minutos não são produtos de degradação. Eles são provavelmente impurezas presentes na composição da daptomicina SQR, já que estes picos também aparecem em cromatogramas obtidos com solução de

daptomicina SQR antes de ser submetida ao processo de degradação. O mesmo ocorreu em outros cromatogramas que serão descritos a seguir (para outros tipos de degradação).

b) Degradação alcalina

A Figura 36 apresenta a representação gráfica da degradação alcalina da daptomicina SQR e os cromatogramas obtidos no primeiro dia de degradação com NaOH 0,1 M (100% de degradação) e NaOH 0,001 M (19,5% de degradação). Estes cromatogramas foram obtidos através da análise imediata das soluções de daptomicina SQR em ambos os solventes (logo após o preparo).

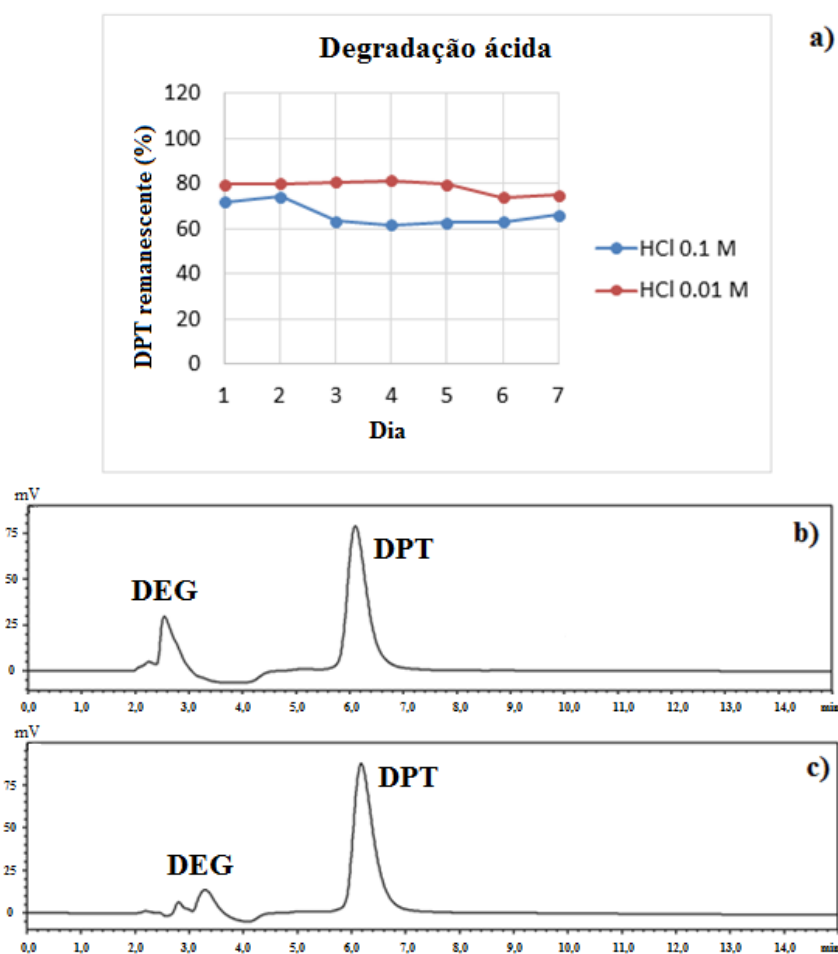
Figura 36- a) Representação gráfica da degradação alcalina de daptomicina; b) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação com NaOH 0,1 M; c) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação com NaOH 0,001 M. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm). DPT: daptomicina. DEG: produto de degradação.



c) Degradação ácida

A Figura 37 apresenta a representação gráfica da degradação ácida da daptomicina SQR e os cromatogramas obtidos no primeiro dia de degradação com HCl 0,1 M (28% de degradação) e HCl 0,01 M (20,5% de degradação). Estes cromatogramas foram obtidos através da análise imediata das soluções de daptomicina SQR em ambos os solventes (logo após o preparo).

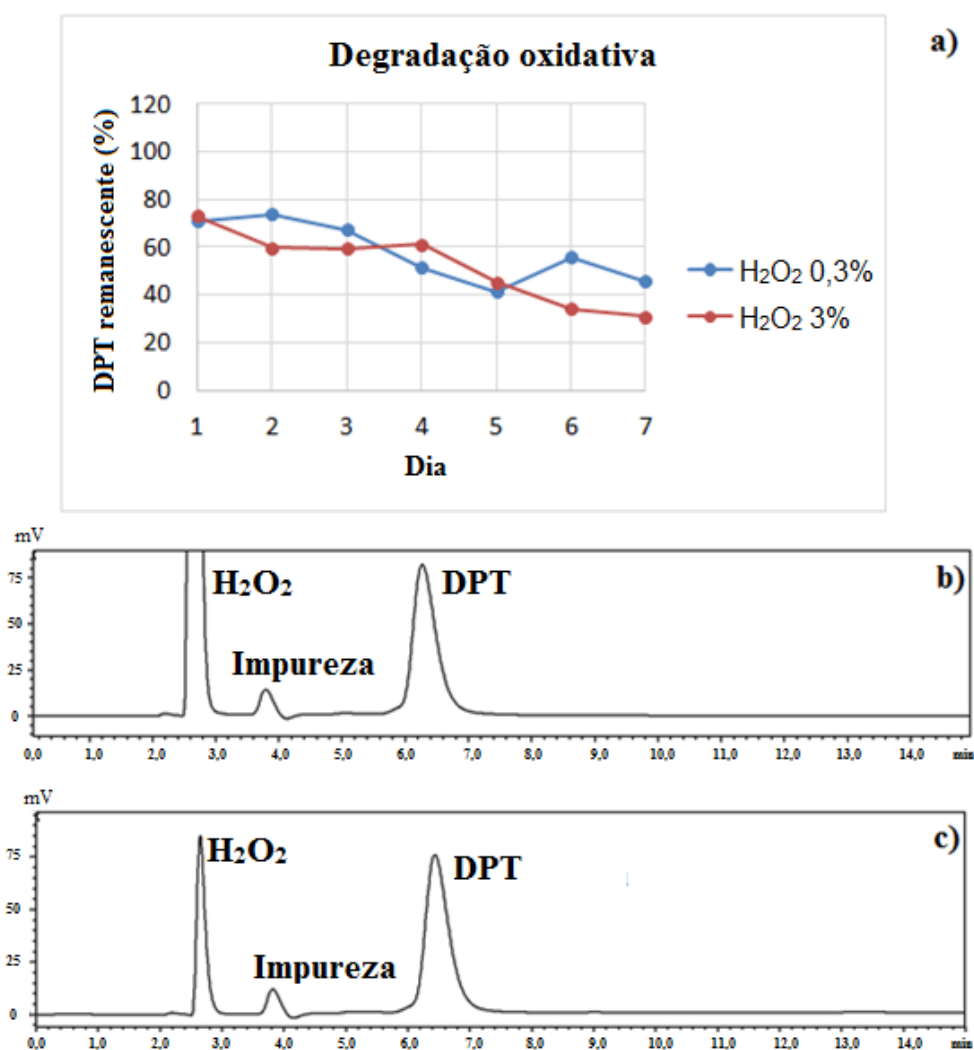
Figura 37- a) Representação gráfica da degradação ácida de daptomicina; b) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação com HCl 0,1 M; c) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação com HCl 0,01 M. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm). DPT: daptomicina. DEG: produto de degradação.



d) Degradação oxidativa

A Figura 38 apresenta a representação gráfica da degradação oxidativa da daptomicina SQR e os cromatogramas obtidos no primeiro dia de degradação com H_2O_2 3% (28,9% de degradação) e H_2O_2 0,3% (26,9% de degradação). Estes cromatogramas foram obtidos através da análise imediata das soluções de daptomicina SQR em ambos os solventes (logo após o preparo).

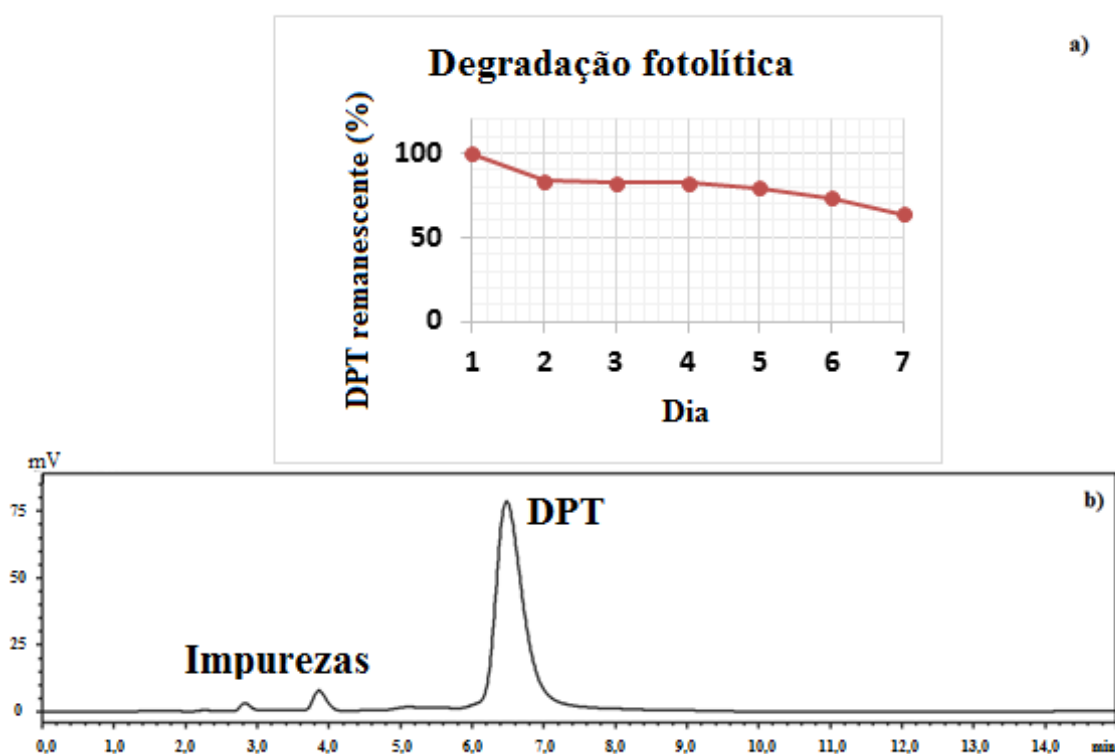
Figura 38- a) Representação gráfica da degradação oxidativa de daptomicina; b) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação com H_2O_2 3%; c) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação com H_2O_2 0,3%. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 μm). DPT: daptomicina.



e) Degradação fotolítica

A Figura 39 apresenta a representação gráfica da degradação fotolítica da daptomicina SQR e os cromatogramas obtidos no segundo dia de degradação, quando a porcentagem de degradação foi de aproximadamente 16,5%.

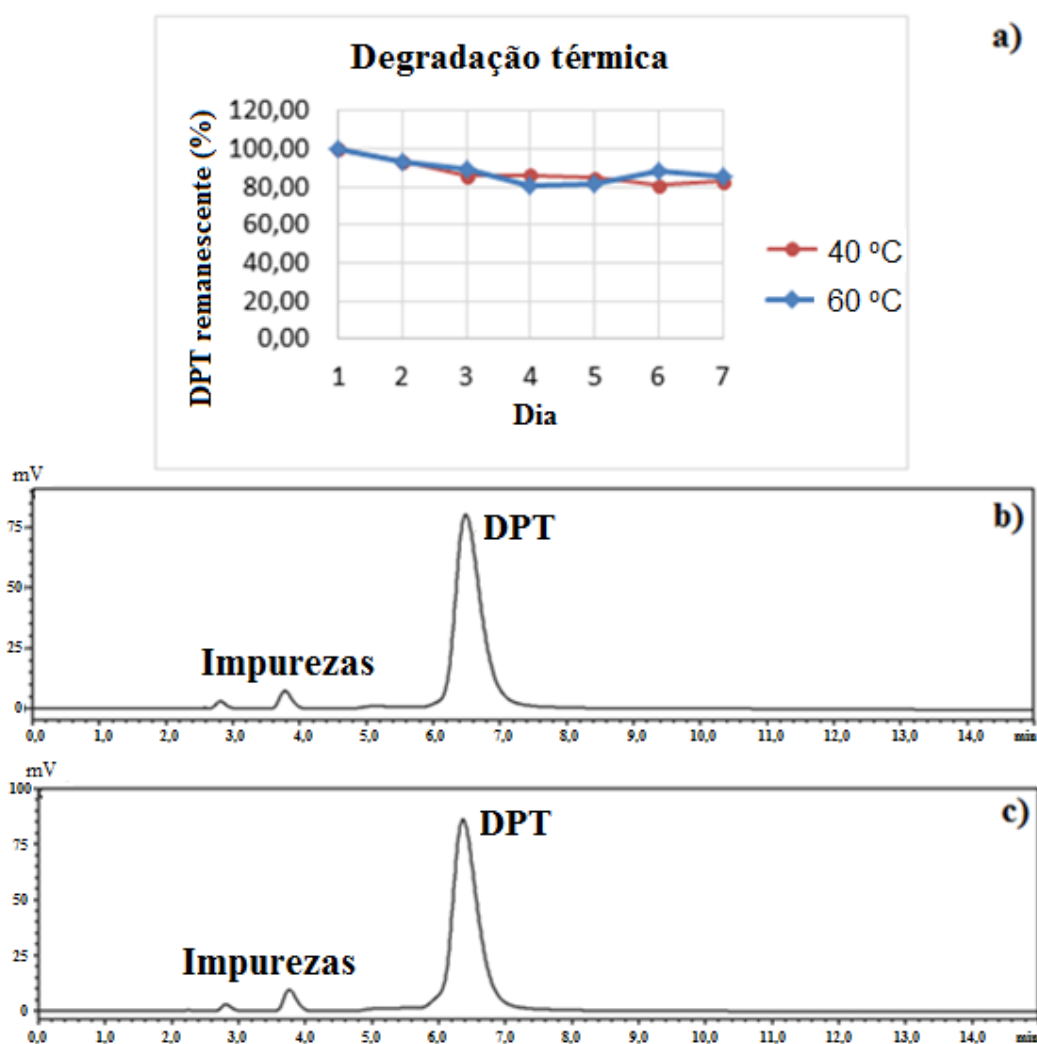
Figura 39- a) Representação gráfica da degradação fotolítica de daptomicina; b) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação fotolítica. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm). DPT: daptomicina.



f) Degradação térmica

A Figura 40 apresenta a representação gráfica da degradação térmica da daptomicina SQR e os cromatogramas obtidos no segundo dia de degradação a 40 °C (28,9% de degradação) e 60 °C (26,9% de degradação).

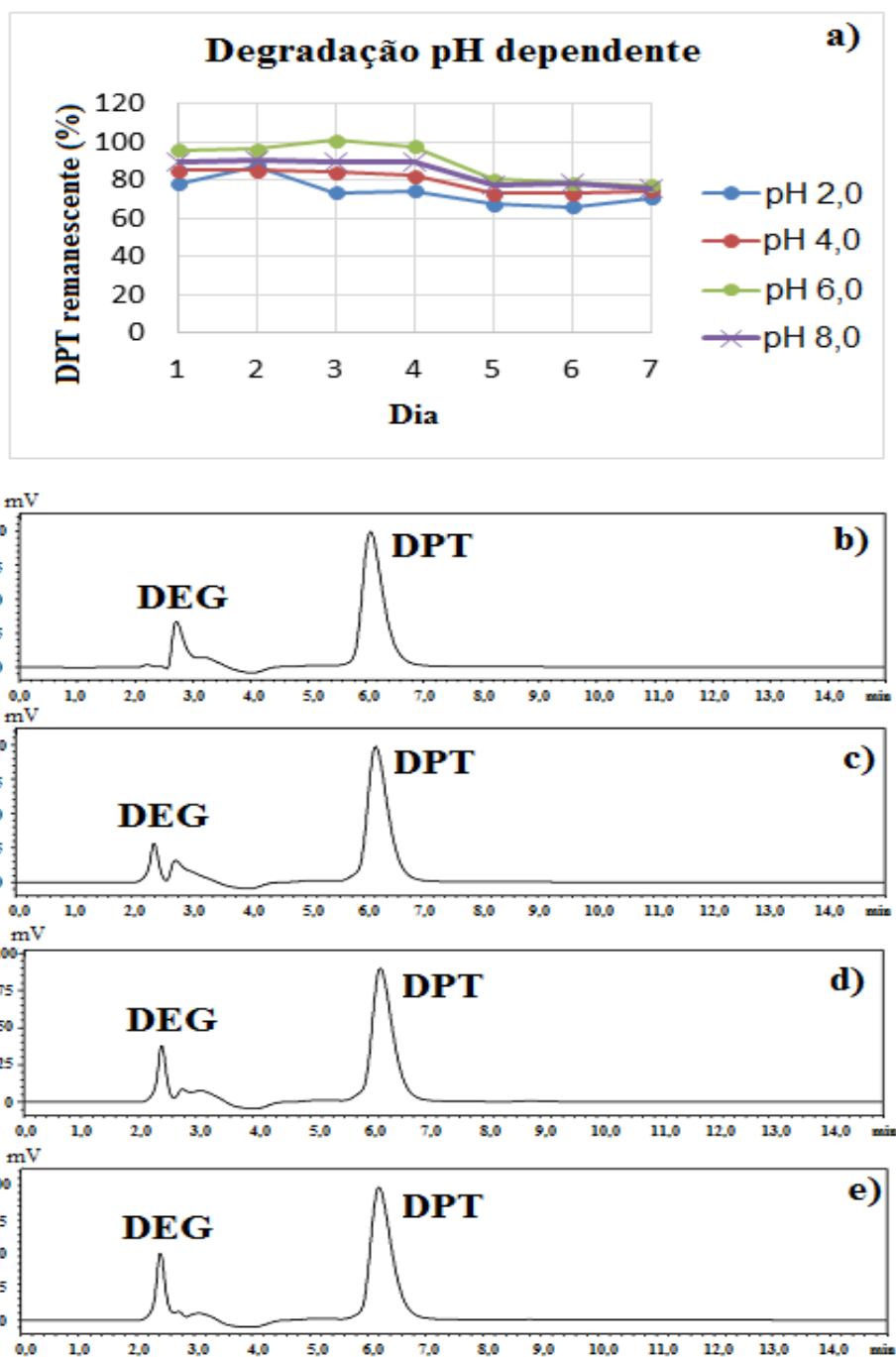
Figura 40- a) Representação gráfica da degradação térmica de daptomicina; b) Cromatograma obtido no segundo dia da degradação a 40 °C; c) Cromatograma obtido no segundo dia da degradação a 60 °C. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm). DPT: daptomicina. DEG: produto de degradação.



g) Degradação pH dependente

A Figura 41 apresenta a representação gráfica da degradação pH dependente da daptomicina SQR e os cromatogramas obtidos nas seguintes condições: no segundo dia de degradação em pH 2,0 e 4,0 (12,7 e 14,8% de degradação, respectivamente), no sexto dia de degradação em pH 6,0 (19,5% de degradação) e no primeiro dia de degradação em pH 8,0 (10% de degradação). Em pH 8,0, o cromatograma foi obtido através da análise imediata da solução de daptomicina SQR (logo após o preparo).

Figura 41- a) Representação gráfica da degradação pH dependente de daptomicina; b) Cromatograma obtido no segundo dia da degradação em pH 2,0; c) Cromatograma obtido no segundo dia da degradação em pH 4,0; d) Cromatograma obtido no sexto dia da degradação em pH 6,0; e) Cromatograma obtido no primeiro dia da degradação em pH 8,0. Fase móvel: água : etanol (45:55, v/v) pH 4,5 ajustado com ácido acético glacial. Fase estacionária: Agilent Zorbax C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm). DPT: daptomicina. DEG: produto de degradação.



8.4.2. Estudos de estabilidade acelerado e de longa duração

A Figura 42 apresenta o perfil de degradação da daptomicina em pó liofilizado obtido durante o estudo de estabilidade acelerado com os três métodos escolhidos (turbidimétrico, CLAE e UV). Os teores obtidos neste estudo estão descritos na Tabela 57. Estes valores foram analisados por análise de variância (ANOVA) e os resultados estão apresentados na Tabela 58.

Figura 42- Perfil de decaimento dos teores de daptomicina em pó liofilizado durante o estudo de estabilidade acelerado, através dos métodos turbidimétrico, CLAE e UV.

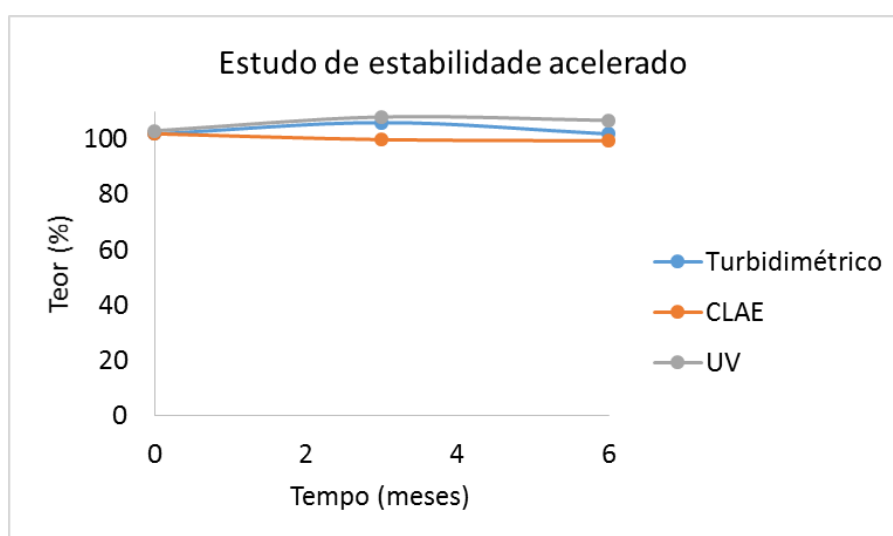


Tabela 57- Valores obtidos na determinação do teor de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável durante estudo de estabilidade acelerado, pelos métodos turbidimétrico, CLAE e UV

Método	Teores (%)		
	Tempo zero	3 meses	6 meses
Turbidimétrico	101,78	105,94	101,82
UV	102,96	107,97	99,79
CLAE	101,90	99,79	99,40
Teor médio (%)	102,21	104,57	102,64
DPR (%)	0,65	4,26	3,72

Tabela 58- Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável durante estudo de estabilidade acelerado

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado*
Entre grupos	2	9,432	4,716	0,437	5,14
Dentro dos grupos	6	64,782	10,797		
Total	8	74,215			

*Significativo para $p < 5\%$

Para o estudo de estabilidade de longa duração, a análise foi realizada da mesma maneira. O perfil de degradação, neste caso, está apresentado na Figura 43, os teores obtidos estão apresentados na Tabela 59 e a análise de variância descrita na Tabela 60.

Figura 43- Perfil de decaimento dos teores de daptomicina em pó liofilizado durante o estudo de estabilidade de longa duração, através dos métodos turbidimétrico, CLAE e UV.

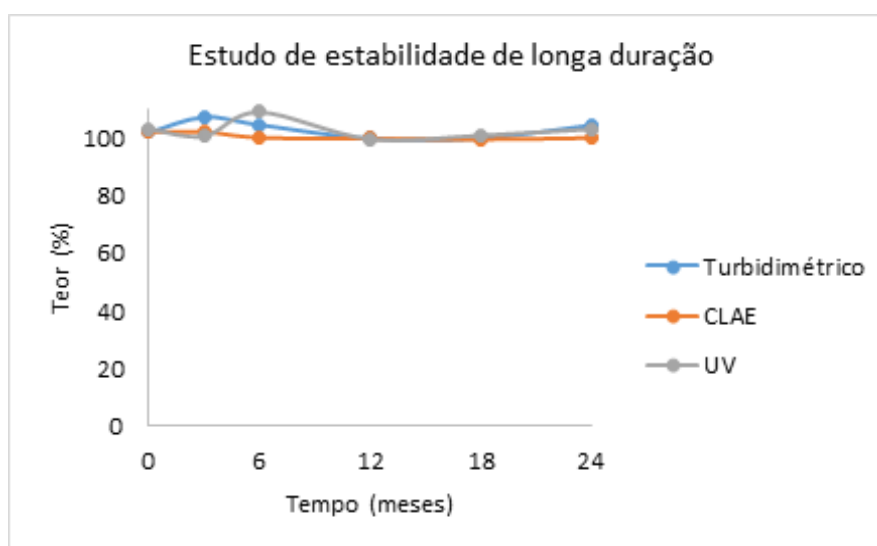


Tabela 59- Valores obtidos na determinação do teor de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável durante estudo de estabilidade de longa duração, pelos métodos turbidimétrico, CLAE e UV

Método	Teores (%)					
	Tempo zero	3 meses	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Turbidimétrico	101,78	107,13	104,47	99,69	99,76	104,34
UV	102,96	100,54	108,85	99,51	100,80	102,98
CLAE	101,90	102,04	100,05	99,68	99,99	99,93
Teor médio (%)	102,21	103,24	104,46	99,63	99,99	102,42
DPR (%)	0,64	3,35	4,21	0,10	0,72	2,21

Tabela 60- Análise de variância dos resultados obtidos para o doseamento de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável durante estudo de estabilidade de longa duração

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado*
Entre grupos	2	20,102	10,051	1,41	3,68
Dentro dos grupos	15	106,906	7,127		
Total	17	127,008			

*Significativo para $p < 5\%$

Quanto às características organolépticas, os pós de daptomicina SQR permaneceram sem nenhuma alteração antes e depois dos estudos de estabilidade.

8.5. Discussão

8.5.1. Estudo de degradação forçada da daptomicina

O estudo de degradação forçada da daptomicina foi realizado a fim de verificar o comportamento químico da molécula sob diferentes condições de estresse (ácida, alcalina, aquosa, oxidativa, térmica e diferentes valores de pH). A daptomicina em sua forma pura (SQR) foi escolhida para a realização do método, ao invés da forma farmacêutica, para evitar interferências do excipiente nas análises. Além disso, estudo de degradação forçada da

daptomicina em pó liofilizado foi realizado em etapa anterior deste trabalho, durante o desenvolvimento do método de CLAE indicativo de estabilidade (seção 6.3). Ambos os estudos não foram comparados nesta discussão devido ao fato de as condições de estresse serem diferentes.

A daptomicina apresentou degradação em todas as condições em que foi submetida, uma vez que o seu pico principal foi reduzido em todos os casos. No entanto, mostrou-se mais estável sob condições aquosas, nas quais após 7 dias de análise, a degradação do fármaco foi de aproximadamente 8%, ou seja, menor em comparação às outras condições testadas, neste mesmo período. Em pH 6,0, a daptomicina também se mostrou estável, já que após 4 dias de experimento, o seu teor manteve-se praticamente inalterado, com degradação de apenas 2%. No entanto, após 7 dias, a degradação aumentou para 23%.

Por outro lado, a daptomicina apresentou menor estabilidade em condições alcalinas. Quando a solução de daptomicina foi preparada em base mais concentrada (NaOH 0,1 M), logo após o preparo, a degradação já foi de 100%. Quando a daptomicina foi submetida a condições mais amenas de alcalinidade (NaOH 0,001 M), seu pico principal reduziu cerca de 20% também logo após o preparo da solução. Neste último caso, o teor do fármaco manteve-se praticamente constante até o último dia da análise, quando a degradação foi de 25%. O mesmo ocorreu quando a daptomicina foi preparada em solução tamponante universal pH 8,0, na qual a daptomicina degradou cerca de 25% após 7 dias. A única diferença foi que o fármaco, neste caso, levou maior tempo para degradar. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura, que mostram que a daptomicina não é estável sob condições alcalinas (CHRIST et al., 2014).

Em condições de pH 2,0, a daptomicina também se mostrou instável, já que logo após o preparo da solução, o pico do fármaco apresentou decréscimo de 20%. Degradação significativa também ocorreu quando a daptomicina foi preparada em HCl 0,1 e HCl 0,01 M. Nestes casos, as degradações foram cerca de 28,0 e 20,5%, respectivamente, também logo após o preparo. A instabilidade de daptomicina sob condições ácidas pode ser um obstáculo para o desenvolvimento de formulações orais. Neste caso, o desenvolvimento de formulações gastrorresistentes pode ser uma solução, se o problema da baixa absorção do fármaco por via oral também for resolvido (LOPES, 2008; SWEETMAN, 2011).

Sob condições oxidativas, o antimicrobiano também não se mostrou estável, uma vez que o fármaco degradou cerca de 54,0 e 70,0%, após 7 dias, quando as soluções foram preparadas em H₂O₂ 0,3% e 3%, respectivamente. Esta instabilidade deve ser considerada

durante o desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica e na escolha do melhor material de acondicionamento.

A questão de quanto tempo o fármaco deve ser degradado é controversa, como já foi abordado anteriormente neste trabalho (seção 6.3.5). A legislação brasileira recomenda uma degradação de 10-30%, enquanto algumas outras referências internacionais recomendam de 5-20% (BRASIL, 2012; BLESSY, 2013). Neste contexto, as Figuras 35-41 apresentam alguns cromatogramas obtidos no estudo de degradação forçada, sendo que em todos eles a degradação da daptomicina foi inferior a 30%.

É possível observar que não há produtos de degradação na maioria dos cromatogramas, embora a área do pico principal da daptomicina já tenha indicado degradação no intervalo aproximado de 5 a 30%, faixa que engloba a literatura internacional e a legislação brasileira para este quesito (BRASIL, 2012; BLESSY, 2013). A ausência de produtos de degradação pode ser explicada por vários fatores, os quais foram expostos anteriormente neste trabalho, na seção 6.3.5 (discussão do desenvolvimento do método de CLAE indicativa de estabilidade).

No entanto, neste caso, a falta de balanço de massas não pode ser atribuída a um produto de degradação de eluição tardia que se liga à coluna analítica, uma vez que o tempo de corrida executado nas análises de CLAE foi de 15 minutos, o que desfaz esta hipótese.

A explicação pode ser a ausência de um cromóforo adequado nos produtos de degradação. Neste caso, outro modo de detecção pode ser utilizado, tal como a espectrometria de massas, a fim de detectar e identificar estes produtos de degradação. Esta é uma questão interessante que pode ser desenvolvida futuramente.

Alguns produtos de degradação da daptomicina já foram identificados, quando obtidos em condições alcalinas, em uma faixa de pH entre 3 e 8 e também na presença de gliceraldeído em soluções ácidas. Estes produtos foram descritos anteriormente neste trabalho, na seção 3.2.10.

Também é importante notar que picos adicionais apareceram em alguns cromatogramas, em 2,2; 2,8 e 3,8 minutos. Não se tratam de produtos de degradação, mas provavelmente impurezas presentes na composição da daptomicina SQR, uma vez que estes picos também apareceram em cromatogramas da daptomicina SQR antes da degradação.

8.5.2. Estudos de estabilidade acelerado e de longa duração

A proposta dos estudos de estabilidade acelerado e de longa duração foi a busca por evidências de como o teor de daptomicina na amostra de pó liofilizado varia com o tempo, sob uma variedade de fatores ambientais pré-definidos pela RE nº 1 de 2005 (BRASIL, 2005).

Nas Figuras 42 e 43 é possível observar o comportamento do teor da daptomicina na amostra de pó liofilizado, quando exposta às condições aceleradas e de longa duração, respectivamente. Estas figuras também fazem uma correlação entre os três métodos utilizados para análise da amostra, sendo eles o método turbidimétrico, CLAE e UV.

Analizando-se os perfis de decaimento dos teores da daptomicina, nas Figuras 42 e 43, observa-se que o teor se manteve praticamente constante, tanto para o estudo de estabilidade acelerado quanto para o de longa duração. Alguns teores, em ambos os casos, apresentaram aumento em relação ao tempo zero. Assim, para verificar se tais diferenças foram significativas estatisticamente, análise de variância (ANOVA) foi realizada para comparar os valores obtidos pelos três métodos, durante todo o período de ambos os estudos de estabilidade.

Os resultados da ANOVA para o estudo de estabilidade acelerado estão apresentados na Tabela 58. Nota-se que o valor de F calculado (0,437) foi menor que o valor de F tabelado (5,14). Desta maneira, conclui-se que durante os 6 meses de análise, os teores se mostraram estatisticamente iguais, a um nível de significância de 5%. Ou seja, não houve degradação da daptomicina.

A Tabela 60 mostra apresenta os resultados da ANOVA para o estudo de estabilidade de longa duração. O valor de F calculado (1,41) também se mostrou menor que o de F tabelado (3,68), o que significa que os teores de daptomicina permaneceram estatisticamente equivalentes durante 24 meses de análise, a um nível de significância de 5%. Desta forma, também não houve degradação da daptomicina neste caso.

Também foi observado que em alguns casos, no mesmo período, houve diferença entre os teores obtidos pelos três métodos utilizados. No entanto, para avaliar se estas diferenças eram significativas, foi calculado o DPR entre os teores em todos os casos, e os resultados estão descritos nas Tabelas 57 e 59. Os valores de DPR foram abaixo de 5,0%, o que mostra que a diferença entre eles não é significativa, já que a precisão de um método analítico pode variar até 5,0% conforme a legislação brasileira (BRASIL, 2003).

Quanto às características organolépticas, os pós permaneceram inalterados após os estudos de estabilidade, permanecendo com coloração amarela-clara e mesmo aspecto.

O objetivo inicial foi avaliar também a ordem das reações, em ambos os estudos de estabilidade. No entanto, como a daptomicina não apresentou degradação estatisticamente significativa, logicamente este estudo não foi realizado. Netz e Ortega (2002) afirmam que quando a degradação de um fármaco é muito baixa, torna-se difícil verificar a ordem da reação, uma vez que todas se comportam como lineares no método dos gráficos.

9. ESTUDO MICROBIOLÓGICO DA DAPTOMICINA

Segundo o Relatório Global de Vigilância em Resistência Antimicrobiana, publicado pela OMS em 2014, a resistência aos antimicrobianos não é mais uma previsão para o futuro, já que está acontecendo neste momento, em todo o mundo, e colocando em risco a capacidade dos sistemas de saúde de tratar infecções comuns adquiridas na comunidade e hospitais. Este relatório ainda ressalta que o mundo está caminhando para uma era “pós-antibiótico”, em que infecções comuns e ferimentos leves, que têm sido por décadas problemas tratáveis, podem voltar a ser letais. Por isso, uma ação mundial coordenada voltada ao combate deste problema é indispensável (WHO, 2014).

Quando bactérias se tornam resistentes a medicamentos de primeira linha, terapias mais dispendiosas são necessárias. Ao mesmo tempo, a maior duração da doença e também do tratamento, que é realizado muitas vezes em hospitais, aumentam os custos dos cuidados em saúde, bem como o fardo econômico sobre a sociedade (WHO, 2014).

Cada vez mais, as bactérias apresentam novos mecanismos de resistência, que se espalham rapidamente por todos os continentes (WHO, 2014). Assim, o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, com a capacidade de contornar estes mecanismos, representa importante avanço para a ciência e prática clínica. Por outro lado, poucos novos agentes antimicrobianos vêm sendo aprovados para uso clínico nos últimos anos (WRIGHT, 2011).

Neste contexto, a daptomicina se destaca, por apresentar mecanismo de ação distinto de todos os outros antimicrobianos disponíveis no mercado (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Este antimicrobiano vem sendo considerado uma importante ferramenta no combate a infecções causadas por bactérias Gram-positivas consideradas desafios para a medicina, tais como MRSA, VRE e VRSA. Relatos de resistência à daptomicina são raros, consequentemente, este fármaco é considerado muito importante para a prática clínica, sendo prescrito em mais de 40 países (SWEETMAN, 2011; MERCK, 2016a).

Apesar do fato de que a daptomicina vem apresentando sucesso no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas resistentes, existem alguns relatos na literatura de resistência a este antimicrobiano, como foi descrito previamente, na revisão bibliográfica (item 3.2.4). Por tal motivo, um dos objetivos desta etapa do trabalho foi realizar um teste de sensibilidade a antibióticos (TSA) por meio de microdiluição em caldo para avaliar a sensibilidade de algumas bactérias Gram-positivas, tais como *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Streptococcus pneumoniae* e VRE, em relação à daptomicina. Este estudo foi

realizado durante estágio sanduíche na *University of South Australia* (UniSA), sob supervisão do Prof. Dr. Sanjay Garg.

Vale ressaltar que a daptomicina ainda não é aprovada para o tratamento de infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*. No entanto, a justificativa para a escolha desta bactéria para o estudo é o fato de alguns trabalhos demonstrarem a capacidade de penetração da daptomicina em meninges inflamadas e sua pronunciada eficácia contra pneumococos resistentes à penicilina e a quinolonas, o que qualifica este antimicrobiano como potencial candidato para o tratamento de meningite pneumocócica (COTTAGNOUD et al., 2004).

Com tudo isso, o uso de terapias associadas, ou seja, a combinação de dois ou mais agentes antimicrobianos para o tratamento de uma determinada infecção, é uma alternativa que pode ser adotada na tentativa de contornar o problema da resistência bacteriana (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Este tipo de terapia é muito utilizado na prática clínica, tanto para aumentar o espectro de atividade quanto para reduzir o desenvolvimento de resistência. Assim, considerando a importância do estudo de novas combinações para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes, outro objetivo deste trabalho foi realizar testes preliminares para avaliar a sinergia entre a daptomicina e novos agentes antimicrobianos, os quais estão em estudo pelo grupo de pesquisa em que este trabalho foi realizado, na UniSA, contra seis cepas de MRSA, através do método de *Checkerboard*.

Métodos de *Checkerboard* avaliam o efeito da combinação de antimicrobianos em diferentes concentrações. Basicamente, é um método de microdiluição em caldo semelhante ao utilizado para as determinações de CIM (HINDLER, 2010). No entanto, existe um outro método também utilizado para avaliar a sinergia entre compostos, que é o *Time-Kill*. Este método avalia o tempo em que a substância-teste leva para matar as células microbianas. Uma das vantagens deste método em relação ao *Checkerboard* é que ele fornece a dinâmica da ação da substância-teste e sua interação com o tempo (MITCHELL et al., 2012). Assim, também foi realizado um ensaio de *Time-Kill* para avaliar a sinergia entre a daptomicina e um dos novos agentes antimicrobianos, em relação à cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923.

9.1. Material

9.1.1. Teste de sensibilidade à daptomicina

Daptomicina em pó liofilizado para preparações injetáveis, descrita no item 4.3, foi utilizada para os ensaios.

Também foram utilizados os seguintes materiais: caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (CAMHB) (Difco, Franklin Lakes, EUA), ágar sangue (Oxoid, Rampshire, Reino Unido), cloreto de cálcio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e ampicilina sódica (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). Todas as soluções foram preparadas a partir de água ultrapurificada obtida através de equipamento Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, EUA).

As cepas testadas, obtidas em hospitais australianos, europeus e asiáticos, e também da coleção da UniSA, foram as seguintes:

- ***S. aureus*:** JL, ATCC 49775, ATCC 29213, T6-47, T6-133, ATCC 25923, T7-A6, WT, 308, ATCC 63580, ATCC 29312, B313 e DW. *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizado como micro-organismo controle.
- ***S. aureus* resistente à metilicina (MRSA):** MRSA 8365, MRSA 4300, MRSA (*classic*), MRSA 4330, MRSA Box 2 G3, MRSA (VSA 300), MRSA 580, MRSA 610, MRSA 372, MRSA WA 1 (ST1), MRSA WA 2 (ST78), MRSA WA 3 (ST5), MRSA WA 84 (ST45), MRSA QLD PVL+ (ST93), MRSA AUS 2 (ST), MRSA AUS 3 (ST), MRSA BENGAL BAY PVL+ (ST772), EMRSA IRISH 1 (ST8), EMRSA IRISH 2 (ST), EMRSA UK 15 (ST22), EMRSA UK 15 PVL+ HA (ST22), EMRSA UK 16 (ST36), EMRSA UK 17 (ST247), cMRSA TAIWAN PVL+ (ST59), MRSA NY JAPAN (ST5), MRSA WSPP (ST30), MRSA USA 300 (ST8) e MRSA-V ST 398 (ST398). *S. aureus* ATCC 29213 foi usado como micro-organismo controle.
- **Enterococos resistentes à vancomicina (VRE):** VRE G9W, VRE 70W, VRE 78W, VRE 45FR, VRE 49FR, VRE 53FR, VRE 55FR, VRE 57FR, VRE 58FR, VRE 58FR, VRE 61FR, VRE 62FR, VRE 284G, VRE 290G, VRE 60FR, VRE 251G, VRE 252G, VRE 257G, VRE 270G e VRE 277G. *E. faecalis* ATCC 29212 foi usado como micro-organismo controle.
- ***S. pneumoniae*:** ATCC 6303, P21, WCH184, WCH77, L8016, TIGR4, WCH43, WCH89, WCH16, D39, WCH57, WCH 158, P9, WCH 86, WCH 137, WCH 46, WCH 211, WU 2, A66.1 e WCH92. *S. pneumoniae* ATCC 6303 foi usado como micro-organismo controle.

Os ensaios foram realizados em placas de microdiluição com 96 poços (Greiner Bio-One, Alemanha). Os inóculos foram padronizados em espectrofotômetro Jenway 6305 (Stone, Reino Unido). Os resultados foram analisados em equipamento leitor de microplacas Multiskan Ascent (Agilent, Santa Clara, CA, EUA), modelo 354.

A incubação das placas foi realizada em incubadora Scientific Equipment Manufacturers (Adelaide, Austrália), modelo SEM. Para as cepas de *S. pneumoniae*, a incubação foi realizada em estufa de CO₂ Sanyo Electric Co (Osaka, Japão), modelo MCO-17A1.

Os seguintes materiais também foram utilizados: balança analítica e micropipetador multicanal digital com 8 canais.

9.1.2. Ensaios preliminares de sinergia

9.1.2.1. Checkerboard

Daptomicina em pó liofilizado para preparações injetáveis, descrita no item 4.3, foi utilizada para os ensaios.

Também foram utilizadas as seguintes substâncias: caldo Mueller-Hinton cation ajustado (CAMHB) (Difco, Franklin Lakes, EUA), ágar sangue (Oxoid, Rampshire, Reino Unido), cloreto de cálcio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e ampicilina sódica (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). As soluções de daptomicina e ampicilina sódica foram preparadas a partir de água ultrapurificada obtida através de equipamento Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, EUA). Algumas soluções foram preparadas com dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

Três fármacos sintetizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Sanjay Garg na UniSA, foram utilizados para os ensaios de sinergia com a daptomicina: LP9666, NCL 195 e NCL 219.

Apenas os códigos destas substâncias foram fornecidos, pois estes produtos estão sob Proteção da Propriedade Intelectual.

As seguintes cepas de MRSA (obtidas em hospitais australianos) foram utilizadas nos ensaios: MRSA 8365, MRSA 4300, MRSA (*classic*), MRSA (VSA 300), MRSA 580 e MRSA 610.

Os ensaios foram realizados em placas de microdiluição com 96 poços (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemanha). Os inóculos foram padronizados em espectrofotômetro Jenway 6305 (Stone, Reino Unido). Os resultados foram analisados em equipamento leitor de microplacas Multiskan Ascent (Agilent, Santa Clara, EUA), modelo 354.

A incubação das placas foi realizada em incubadora Scientific Equipment Manufacturers (Adelaide, Austrália), modelo SEM.

9.1.2.2. *Time-Kill*

Daptomicina em pó liofilizado para preparações injetáveis, descrita no item 4.3, foi utilizada para os ensaios.

Um dos fármacos sintetizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Sanjay Garg na UniSA também foi empregado, o LP9666 (UniSA, Adelaide, Austrália). Apenas o código desta substância foi fornecido, pois encontra-se sob Proteção da Propriedade Intelectual.

A cepa testada nos ensaios foi o *S. aureus* ATCC 25923.

Também foram utilizadas as seguintes substâncias: caldo Mueller-Hinton (Difco, Franklin Lakes, EUA), ágar Mueller-Hinton (Difco, Franklin Lakes, EUA) e cloreto de cálcio (Synth, Diadema, Brasil). As soluções de daptomicina e LP9666 foram preparadas a partir de água ultrapurificada obtida através de equipamento Milli-Q Plus (Millipore, Billerica, EUA). As soluções de LP9666 também foram preparadas com adição de dimetilsulfóxido (DMSO) (Impex, Varginha, Brasil).

Antes da realização do ensaio de *Time-Kill*, foi realizado um ensaio de *Cherckerboard* para verificar os valores de CIM para cada um dos fármacos utilizados individualmente e também em conjunto, para a definição das concentrações de trabalho a serem utilizadas no ensaio de *Time-Kill*. Para isso, foram utilizadas placas de microdiluição com 96 poços (Kasvi, Curitiba, Brasil). Os resultados deste ensaio foram avaliados após a revelação com solução de resazurina na concentração de 100 µg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

Os inóculos foram padronizados em espectrofotômetro Pharmacia LKB-Ultraspec III (Milpitas, EUA). A incubação das placas foi realizada em incubadora Solab SL-101 (Piracicaba, Brasil).

9.2. Método

9.2.1. Teste de sensibilidade à daptomicina

O teste de sensibilidade a antibióticos (TSA) foi realizado pelo método de microdiluição em caldo. Para isso, quatro bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, MRSA, *Streptococcus pneumoniae* e VRE) foram submetidas ao método de microdiluição em caldo para avaliar a sensibilidade à daptomicina. No total, 79 cepas foram testadas, além dos quatro controles.

O método foi realizado de acordo com o recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Ampicilina sódica foi utilizada como controle, assim como cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC), para cada bactéria.

9.2.1.1. Preparo das soluções de daptomicina

Uma solução estoque de daptomicina em pó liofilizado foi preparada na concentração de 1000 µg/mL. Para isso, primeiramente foi verificado o peso médio de três frascos-ampola de daptomicina (descritos no item 4.3) e preparado um *pool* de amostras, conforme descrito no item 5.3.2.1.3.1. A partir deste *pool*, o equivalente a 10,0 mg de daptomicina foi analiticamente pesado e transferido para balão volumétrico de 10 mL. O volume do balão volumétrico foi completado com água ultrapurificada para obtenção de solução estoque de 1000 µg/mL.

A partir desta solução estoque, outra solução, com o dobro da maior concentração do teste, foi preparada. Considerando que a maior concentração do teste foi 16,0 µg/mL, esta solução foi preparada na concentração de 32,0 µg/mL. Para isso, 320 µL da solução estoque de daptomicina foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL. O volume do balão foi completado com o meio de cultura escolhido para o ensaio (caldo), resultando em solução na concentração de 32,0 µg/mL.

9.2.1.2. Preparo das soluções de ampicilina sódica (para controle do método)

Foi preparada uma solução estoque de ampicilina sódica na concentração de 1000 µg/mL. Para isso, foram pesados analiticamente 10,0 mg de ampicilina sódica, depois transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água ultrapurificada, para obtenção de solução estoque com concentração teórica de 1000 µg/mL.

A partir desta solução estoque, outra solução, com o dobro da maior concentração do teste, foi preparada. Considerando que a maior concentração do teste foi 16,0 µg/mL, esta solução foi preparada na concentração de 32,0 µg/mL. O preparo desta solução foi realizado conforme descrito no item 9.2.1.1 para a solução de daptomicina.

9.2.1.3. Preparo do inóculo

Um dia antes do ensaio, placas de Petri contendo ágar sangue foram inoculadas com as bactérias a serem testadas, e em seguida foram incubadas durante 18 a 24 horas, a 35 °C. No

dia do ensaio, colônias isoladas foram removidas do ágar sangue e transferidas para solução salina, formando uma suspensão. Depois disso, esta suspensão foi ajustada para atingir uma turvação correspondente a 0,5 da escala McFarland. Este procedimento resultou em uma suspensão contendo aproximadamente $1,0$ a $2,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Para executar este passo de maneira precisa, foi utilizado um espectrofotômetro. Esta suspensão, após preparada e ajustada, foi diluída em solução salina e uma proporção 1:20 (v/v), resultando em suspensão com $5,0 \times 10^6$ UFC/mL.

Em etapa posterior, 0,01 mL desta suspensão foi adicionada aos poços de uma microplaca, que já continham 0,1 mL do meio de cultura selecionado para o ensaio (caldo). Desta forma, a concentração final de bactérias foi de aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/mL.

9.2.1.4. Meios de cultura

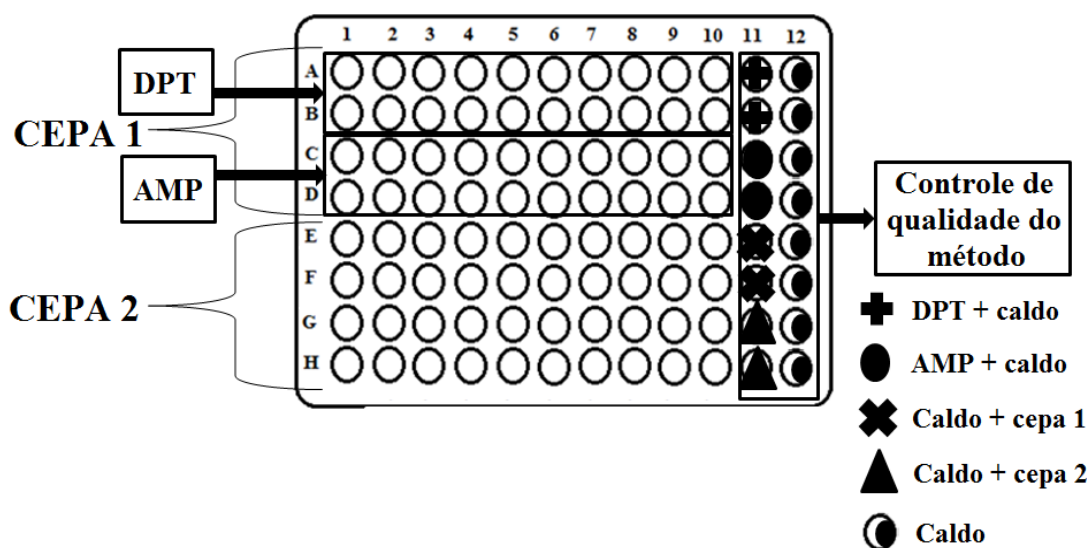
Os meios de cultura utilizados para os ensaios foram escolhidos de acordo com as necessidades nutricionais de cada bactéria, como descrito a seguir:

- *Staphylococcus aureus*, MRSA e VRE: CAMHB suplementado com 50 µg/mL de cálcio;
- *Streptococcus pneumoniae*: CAMHB com 5% de sangue de cavalo lisado e suplementado com 50 µg/mL de cálcio.

9.2.1.5. Procedimento

Para realizar o método de microdiluição em caldo, placas de microdiluição com 96 poços foram utilizadas. Cada cepa foi testada em duplicata em relação à daptomicina e também em relação ao controle (ampicilina sódica).

O procedimento foi realizado de acordo a Figura 44 e será descrito a seguir.

Figura 44- Esquema do método de microdiluição em caldo.

DPT: daptomicina; AMP: ampicilina sódica

a) Primeiramente, 100 μL do meio de cultura selecionado para o método (de acordo com o descrito no item 9.2.1.4) foram transferidos para cada poço da microplaca.

b) Depois disso, alíquotas de 100 μL da solução de daptomicina (na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$, descrita no item 9.2.1.1) foram transferidas para os poços de número 1 das linhas A e B e também das linhas E e F, e assim foi realizada uma diluição seriada até os poços de número 10. Para isso, alíquotas de 100 μL do primeiro poço foram transferidas para o segundo e assim por diante, até o último poço, o qual teve uma alíquota de 100 μL descartada no final. Assim, todos os poços continham 100 μL no final do processo. No final, as concentrações de trabalho de daptomicina foram de 16,0; 8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,03125 $\mu\text{g/mL}$, nos poços de 1 a 10, respectivamente.

c) O mesmo procedimento foi realizado para a ampicilina sódica, nas linhas C e D e também nas linhas G e H.

d) Posteriormente, após a padronização do inóculo, alíquotas de 10 μL da suspensão de micro-organismo foram adicionadas em cada poço da placa de microdiluição. Como apresentado na Figura 44, as quatro primeiras linhas foram adicionadas com a suspensão de um determinado micro-organismo e as quatro últimas linhas com outro micro-organismo. Assim, duas cepas diferentes foram testadas em cada placa de microdiluição.

e) As duas últimas colunas da placa de microdiluição (colunas 11 e 12) foram usadas para o controle de qualidade do método. Nos poços da coluna 11, foram adicionados apenas daptomicina e meio de cultura (sem bactéria); ampicilina sódica e meio de cultura (também sem bactéria) e meio de cultura e bactéria (sem os fármacos). Na coluna 12 foi adicionado apenas meio de cultura.

f) As placas de microdiluição foram incubadas dentro de 15 minutos após a adição do inóculo. As condições de incubação estão descritas a seguir:

- *Staphylococcus aureus* e MRSA: a 35 ± 2 °C (em estufa convencional) por 20 horas;
- *Streptococcus pneumoniae*: a 35 ± 2 °C (em estufa de CO₂) por 24 horas;
- VRE: a 35 ± 2 °C (em estufa convencional) por 24 horas.

g) Por último, após o período de incubação, a concentração inibitória mínima (CIM) foi verificada com o auxílio de leitor de microplacas.

9.2.2. Ensaios preliminares de sinergia

9.2.2.1. Checkerboard

Ensaios preliminares de sinergia entre a daptomicina e três novos agentes antimicrobianos (LP9666, NCL 195 e NCL 219) foram realizados através do método de *Checkerboard* descrito por Pillai, Moellering e Eliopoulos (2005), o qual foi adaptado para este trabalho.

9.2.2.1.1. Preparo das soluções de daptomicina

Solução estoque de daptomicina em pó liofilizado, na concentração de 1000 µg/mL, foi preparada conforme o descrito no item 9.2.1.1. A partir desta solução estoque, outra solução, com o dobro da maior concentração do teste, foi preparada, usando CAMHB (suplementado com 50 µg/mL de cálcio) como solvente. Considerando que a maior concentração do teste foi 2,0 µg/mL (que representa quatro vezes a CIM obtida experimentalmente para as cepas de MRSA a serem testadas), esta solução foi preparada na concentração de 4,0 µg/mL. Para isso, 40 µL da solução estoque de daptomicina foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL. O volume do balão foi completado com o CAMHB suplementado com cálcio, resultando em solução na concentração de 4,0 µg/mL.

9.2.2.1.2. Preparo das soluções de LP9666, NCL 195 e NCL 219

LP9666, NCL 195 e NCL 219 não são livremente solúveis em água. Neste caso, primeiramente, uma solução 200 vezes mais concentrada que a maior concentração a ser testada de cada agente antimicrobiano foi preparada, utilizando DMSO como solvente. As concentrações mais elevadas testadas foram de 16,0; 8,0 e 8,0 µg/mL para LP9666, NCL 195 e NCL 219, respectivamente. Estas concentrações representam quatro vezes os valores de CIM obtidos experimentalmente para as cepas de MRSA a serem testadas. Assim, solução estoque na concentração de 3200 µg/mL foi preparada para LP9666 e soluções estoques na concentração de 1600 µg/mL foram preparadas para NCL 195 e NCL 219.

Depois disso, diluições seriadas (de duas vezes) das soluções estoque foram realizadas em DMSO. Para isso, volumes de 100 µL de DMSO foram adicionados em 8 poços de uma placa de microdiluição. Depois disso, 100 µL da solução estoque (preparada em concentração 200 vezes maior que a maior concentração a ser testada) foi adicionada apenas no primeiro poço. Posteriormente, diluições seriadas foram realizadas até o oitavo poço, através da transferência de 100 µL do primeiro poço para o segundo, e assim por diante, para a obtenção de soluções 100 vezes mais concentradas que as soluções a serem testadas.

Para determinadas etapas do experimento, foi necessário preparar uma solução estoque contendo LP9666 e NCL 195. Assim, foi preparada uma solução contendo 3200 µg/mL de LP9666 e 1600 µg/mL de NCL 195. Depois disso, diluições seriadas foram realizadas da mesma forma descrita anteriormente.

Em um próximo passo, que será descrito posteriormente, estas soluções foram diluídas cem vezes para a obtenção de soluções com as concentrações de trabalho selecionadas para o método.

9.2.2.1.3. Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado de acordo com o descrito no item 9.2.1.3, durante o teste de sensibilidade à daptomicina.

9.2.2.1.4. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o CAMHB suplementado com 50 µg/mL de cálcio.

9.2.2.1.5. Procedimento

9.2.2.1.5.1. Combinações entre os agentes antimicrobianos

Os ensaios preliminares de sinergia foram realizados através do método de *Checkerboard* descrito por Pillai, Moellering e Eliopoulos (2005), o qual foi adaptado para este trabalho. Para isso, o método de microdiluição em caldo foi empregado para comparar os valores de CIM obtidos quando a daptomicina é testada individualmente frente selecionadas cepas de MRSA, com os valores de CIM encontrados quando a daptomicina é combinada com outros agentes antimicrobianos, usando uma placa de microdiluição de 96 poços.

Na primeira etapa do experimento, combinações simples entre a daptomicina e cada agente antimicrobiano mencionado anteriormente foram realizadas. A Tabela 61 apresenta as combinações realizadas. Além disso, os valores de CIM da daptomicina, NCL 195 e NCL 219 também foram verificados em relação às cepas de MRSA, quando utilizados individualmente. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 61- Combinações entre daptomicina e LP9666, NCL 195 e NCL 219, realizadas durante a primeira etapa dos estudos preliminares de sinergia

	DPT ¹ + LP9666		DPT + NCL 195		DPT + NCL 219	
	DPT	LP9666	DPT	NCL 195	DPT	NCL 219
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
1	2,0	16,0	2,0	8,0	2,0	8,0
2	1,0	8,0	1,0	4,0	1,0	4,0
3	0,5	4,0	0,5	2,0	0,5	2,0
4	0,25	2,0	0,25	1,0	0,25	1,0
5	0,125	1,0	0,125	0,5	0,125	0,5
6	0,0625	0,5	0,0625	0,25	0,0625	0,25
7	0,0312	0,25	0,0312	0,125	0,0312	0,125
8	0,0156	0,125	0,0156	0,0625	0,0156	0,0625

¹ DPT: daptomicina

Na segunda etapa do experimento, sinergia entre a daptomicina, LP9666 e NCL 195 foi verificada. A Tabela 62 mostra as combinações realizadas neste caso. Além disso, os seguintes valores de CIM também foram verificados: daptomicina, LP9666 e NCL 195,

empregados individualmente; daptomicina + LP9666; daptomicina + NCL 195; e LP9666 + NCL 195. As concentrações testadas de cada um deles estão descritas na Tabela 61. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 62- Combinações entre daptomicina, LP9666 e NCL 195, realizadas durante a segunda etapa dos estudos preliminares de sinergia

DPT¹ + LP9666 + NCL 195			
	DPT	LP9666	NCL 195
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
1	2,0	16,0	8,0
2	1,0	8,0	4,0
3	0,5	4,0	2,0
4	0,25	2,0	1,0
5	0,125	1,0	0,5
6	0,0625	0,5	0,25
7	0,0312	0,25	0,125
8	0,0156	0,125	0,0625

¹DPT: daptomicina

9.2.2.1.5.2. Procedimento geral

Para cada cepa testada, o seguinte procedimento foi realizado:

a) Primeiramente, 100 µL de caldo CAMHB (suplementado com cálcio) foram adicionados em cada poço da microplaca. Depois disso, 100 µL da solução de daptomicina (4,0 µg/mL) foram transferidos para o primeiro poço, e em seguida uma diluição seriada foi realizada. Para isso, uma alíquota de 100 µL foi transferida do primeiro para o segundo poço, e este procedimento foi repetido em sequência até a última concentração desejada (a menor a ser testada, ou seja, 0,0156 µg/mL). Uma alíquota de 100 µL foi descartada deste último poço, para que todos eles contivessem um volume total de 100 µL.

b) 1,0 µL de cada poço foi descartado, a fim de obter um volume total de 99 µL em cada um deles.

c) Depois disso, alíquotas de 1,0 µL das soluções de LP9666, NCL 195 ou NCL 219 foram adicionadas nos poços pré-definidos (ou uma alíquota de 1,0 µL de solução de LP9666

+ NCL 195, quando o objetivo foi testar a sinergia entre os três antimicrobianos ao mesmo tempo).

d) Posteriormente, dentro de 15 minutos após o inóculo ter sido padronizado, 10 µL da suspensão foram distribuídos em cada poço da placa de microdiluição.

e) As placas de microdiluição foram incubadas a 35 ± 2 °C, em estufa convencional, por 16 a 20 horas.

f) Após o período de incubação, a concentração inibitória mínima (CIM) foi verificada com o auxílio de um leitor de microplacas.

9.2.2.1.6. Avaliação da interação entre os antimicrobianos testados

Com o objetivo de avaliar a interação entre os três antimicrobianos, foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), de acordo com as Equações 22 e 23 (PILLAI; MOELLERING; ELIOPOULOS, 2005).

$$ICIF_{CD} = \left(\frac{CIM_{DPT \text{ na combinação}}}{CIM_{DPT}} \right) + \left(\frac{CIM_{LP9666 \text{ (ou NCL) na combinação}}}{CIM_{LP9666 \text{ (ou NCL)}}} \right) \quad \text{Equação 22}$$

$$ICIF_{CT} = \left(\frac{CIM_{DPT \text{ na combinação}}}{CIM_{DPT}} \right) + \left(\frac{CIM_{LP9666 \text{ na combinação}}}{CIM_{LP9666}} \right) + \left(\frac{CIM_{NCL195 \text{ na combinação}}}{CIM_{NCL195}} \right) \quad \text{Equação 23}$$

Nas quais:

$ICIF_{CD}$ = índice de concentração inibitória fracionada (para combinação entre dois agentes antimicrobianos)

$ICIF_{CT}$ = índice de concentração inibitória fracionada (para combinação entre três agentes antimicrobianos)

$CIM_{DPT \text{ na combinação}}$ = concentração inibitória mínima da daptomicina após a combinação

CIM_{DPT} = concentração inibitória mínima da daptomicina antes da combinação

$CIM_{LP9666 \text{ (ou NCL) na combinação}}$ = concentração inibitória mínima do LP9666 (ou NCL 195 ou NCL 219) após a combinação

$CIM_{LP9666 \text{ (ou NCL)}}$ = concentração inibitória mínima do LP9666 (ou NCL 195 ou NCL 219) antes da combinação

$CIM_{LP9666 \text{ na combinação}}$ = concentração inibitória mínima do LP9666 após a combinação

CIM_{LP9666} = concentração inibitória mínima do LP9666 antes da combinação

$CIM_{NCL195 \text{ na combinação}}$ = concentração inibitória mínima do NCL195 após a combinação

CIM_{NCL195} = concentração inibitória mínima do NCL195 antes da combinação

Após o cálculo do ICIF, a interação entre os antimicrobianos foi avaliada segundo classificação descrita por Lee, Jang e Cha (2012) e Kumar, Siji e Nambisan (2012), de acordo com Tabela 63.

Tabela 63- Classificação da interação entre antimicrobianos

Interação	ICIF ¹
Sinergismo	$\leq 0,5$
Adição	$0,5 < ICIF \leq 1,0$
Indiferença	$1,0 < ICIF \leq 2,0$
Antagonismo	$> 2,0$

¹ ICIF: índice de concentração inibitória fracionada

9.2.2.2. *Time-Kill*

9.2.2.2.1. Definição das concentrações de trabalho

Para a definição das concentrações de trabalho a serem testadas no ensaio de *Time-Kill*, primeiramente foi realizado um *Checkerboard*, assim como descrito no item 9.2.2.1 (Tabela 61). Assim, os valores de CIM para a daptomicina e LP9666 foram verificados antes e depois da combinação. As concentrações utilizadas no ensaio de *Time-Kill* foram duas vezes os valores de CIM encontrados para cada antimicrobiano após a combinação. Ampicilina foi usada como controle.

Com o objetivo de avaliar a interação entre os dois antimicrobianos, foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), de acordo com a Equação 22 (PILLAI; MOELLERING; ELIOPOULOS, 2005).

As únicas diferenças para o método descrito no item 9.2.2.1 são:

- O meio de cultura utilizado foi o caldo Mueller-Hinton suplementado com 50 µg/mL com cálcio (e não CAMHB).
- As leituras foram realizadas após revelação com solução de resazurina 100 µg/mL e não em leitor de microplacas. Para isso, após o tempo de incubação, foram adicionados 30 µL de solução de resazurina (100 µg/mL) em cada poço da

microplaca. Depois disso, a microplaca foi levada novamente em estufa convencional, a 35 ± 2 °C, por 2 horas. Depois deste período, a leitura foi realizada. Foi considerado que poços com coloração rosa representavam presença de crescimento microbiano e aqueles com coloração azul representavam ausência de crescimento (PALOMINO et al., 2002).

9.2.2.2.2. Preparo da solução de daptomicina

Uma solução estoque de daptomicina em pó liofilizado foi preparada na concentração de 100 µg/mL. Para isso, primeiramente foi verificado o peso médio de três frascos-ampola de daptomicina (descritos no item 4.3) e preparado um *pool* de amostras, conforme descrito no item 5.3.2.1.3.1. A partir deste *pool*, o equivalente a 2,0 mg de daptomicina foi analiticamente pesado e transferido para balão volumétrico de 20 mL. O volume do balão volumétrico foi completado com caldo Mueller-Hinton (suplementado com cálcio) para obtenção de solução estoque de 100 µg/mL.

A partir desta solução estoque, outra solução, com 1,25 µg/mL, foi preparada. Para isso, 62,5 µL da da solução estoque de daptomicina foram transferidos para balão volumétrico de 5 mL. O volume do balão foi completado com caldo Mueller-Hinton (suplementado com cálcio), resultando em solução na concentração de 1,25 µg/mL.

9.2.2.2.3. Preparo da solução de LP9666

Uma solução estoque de LP9666 foi preparada na concentração de 100 µg/mL. Para isso, 2,0 mg de LP9666 foram analiticamente pesados e transferidos para balão volumétrico de 20 mL. Depois disso, 2 mL de DMSO foram transferidos ao fármaco pesado para auxiliar na sua solubilização. Em seguida, o volume do balão volumétrico foi completado com caldo Mueller-Hinton para obtenção de solução estoque de 100 µg/mL.

A partir desta solução estoque, outra solução, com 1,25 µg/mL, foi preparada. Para isso, 62,5 µL da da solução estoque de LP9666 foram transferidos para balão volumétrico de 5 mL. O volume do balão foi completado com caldo Mueller-Hinton, resultando em solução na concentração de 1,25 µg/mL.

9.2.2.2.4. Preparo da solução de daptomicina + LP9666

Soluções estoque de daptomicina e LP9666, na concentração de 100 µg/mL, foram preparadas individualmente, como descrito nos itens anteriores. Depois disso, 62,5 µL da solução estoque de daptomicina e 62,5 µL da solução estoque de LP9666 foram transferidos analiticamente para balão volumétrico de 5 mL. O volume do balão foi completado com caldo Mueller-Hinton (suplementado com cálcio). Isto resultou em uma solução contendo 1,25 µg/mL de daptomicina e 1,25 µg/mL de LP9666.

9.2.2.2.5. Preparo do inóculo

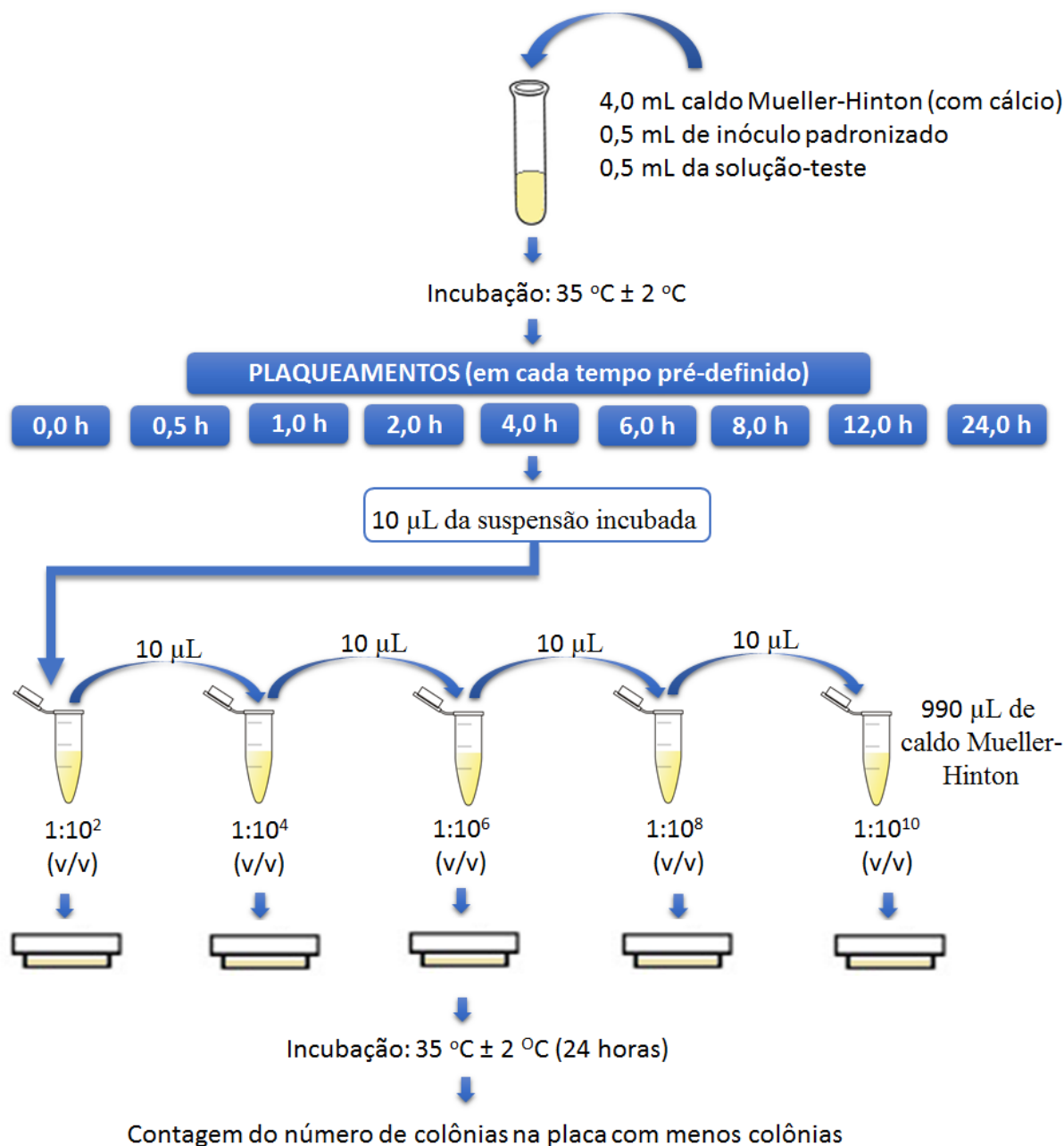
Um dia antes do ensaio, 3 mL de caldo Mueller-Hinton foram inoculados com *S. aureus* ATCC 25923. Em seguida, o inóculo foi incubado durante 24 horas, a 35 °C. No dia do ensaio, esta suspensão foi ajustada para atingir turvação correspondente a 0,5 da escala McFarland. Este procedimento resultou em uma suspensão contendo aproximadamente 1,0 a $2,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Para executar este passo de maneira precisa, foi utilizado espectrofotômetro.

9.2.2.2.6. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o caldo Mueller-Hinton suplementado com 50 µg/mL de cálcio.

9.2.2.2.7. Procedimento

Este ensaio foi realizado através de modificações no método descrito na norma M26-A do *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1999), de acordo com trabalho publicado por Rozatto (2012). As concentrações utilizadas no ensaio de Time-Kill foram duas vezes os valores de CIM encontrados para cada antimicrobiano após a combinação, determinados em etapa anterior deste trabalho, através de método de *Checkerboard* adaptado de Pillai, Moellering e Eliopoulos (2005) (descrito no item 9.2.2.2.1). Além do ensaio realizado com a daptomicina + LP9666, outros três ensaios também foram feitos: um controle de crescimento, um ensaio com a daptomicina e outro com o LP9666, individualmente (nas mesmas concentrações usadas no ensaio de sinergia). A Figura 45 apresenta uma ilustração da técnica seguida, a qual será descrita com detalhes em seguida.

Figura 45- Esquema do método de *Time-Kill*.

9.2.2.2.7.1. Preparo dos ensaios

Os ensaios foram realizados conforme o descrito a seguir:

- a) Ensaio de sinergia (daptomicina + LP9666):** em tubo de ensaio contendo 4 mL de caldo Mueller-Hinton (suplementado com cálcio), foram adicionados 0,5 mL da solução de daptomicina + LP9666 (na concentração de 1,25 µg/mL) e 0,5 mL do inóculo padronizado (como descrito no item 9.2.2.2.5). Assim, a concentração de cada antimicrobiano no tubo foi de 0,125 µg/mL, a qual representa duas vezes os

valores de CIM de cada um deles após a combinação (determinados como descrito no item 9.2.2.2.1).

- b) Ensaio da daptomicina:** em tubo de ensaio contendo 4 mL de caldo Mueller-Hinton (suplementado com cálcio), foram adicionados 0,5 mL da solução de daptomicina (na concentração de 1,25 µg/mL) e 0,5 mL do inóculo padronizado (como descrito no item 9.2.2.2.5). Assim, a concentração de daptomicina no tubo foi de 0,125 µg/mL, a qual representa duas vezes a CIM deste antimicrobiano após a combinação com o LP9666 (determinada como descrito no item 9.2.2.2.1).
- c) Ensaio do LP9666:** em tubo de ensaio contendo 4 mL de caldo Mueller-Hinton (suplementado com cálcio), foram adicionados 0,5 mL da solução de LP9666 (na concentração de 1,25 µg/mL) e 0,5 mL do inóculo padronizado (como descrito no item 9.2.2.2.5). Assim, a concentração de LP9666 no tubo foi de 0,125 µg/mL, a qual representa duas vezes a CIM deste antimicrobiano após a combinação com a daptomicina (determinada como descrito no item 9.2.2.2.1).
- d) Controle de crescimento:** em tubo de ensaio contendo 4,5 mL de caldo Mueller-Hinton (suplementado com cálcio), foram adicionados 0,5 mL do inóculo padronizado (como descrito no item 9.2.2.2.5).

Após o preparo descrito anteriormente, os tubos de ensaio foram levados à estufa a 35 °C ± 2 °C.

Obs: em etapa anterior, o inóculo foi padronizado de acordo com a escala 0,5 de McFarland, resultando em uma suspensão contendo aproximadamente 1,0 a 2,0 x 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Ao adicionar 0,5 mL desta suspensão nos tubos que representam cada ensaio, foi feita uma diluição 1:10 (v/v), então a concentração final de bactérias foi de aproximadamente 1,0 a 2,0 x 10⁷ UFC/mL.

9.2.2.2.7.2. Plaqueamentos

Plaqueamentos foram realizados nos seguintes tempos: 0,0 h; 0,5 h; 1,0 h; 2,0 h; 4,0 h; 6,0 h; 8,0 h, 12,0 h e 24,0 h. Para isso, o seguinte procedimento foi realizado, em cada um destes tempos e para cada um dos quatro ensaios concretizados:

- a)** Alíquota de 10 µL do tubo de ensaio incubado foi transferida para tubo de microcentrífuga contendo 990 µL de caldo Mueller-Hinton (suplementado com

cálcio), realizando-se uma diluição $1:10^2$ (v/v). O conteúdo do tubo foi homogeneizado, e 10 μL foram transferidos para um próximo tubo de microcentrífuga contendo 990 μL de caldo Mueller-Hinton (suplementado com cálcio), obtendo-se diluição $1:10^4$ (v/v). Este procedimento foi realizado mais três vezes, para a obtenção das diluições $1:10^6$ (v/v), $1:10^8$ (v/v) e $1:10^{10}$ (v/v).

- b) A partir de cada uma das cinco diluições preparadas ($1:10^2$, $1:10^4$, $1:10^6$, $1:10^8$ e $1:10^{10}$), um plaqueamento foi realizado. Para isso, 10 μL da diluição correspondente foram transferidos para placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton e o espalhamento foi feito com auxílio de alça de Drigalski.
- c) As placas foram incubadas por 24 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- d) Após a incubação, uma das cinco placas que representam cada diluição foi escolhida para ser analisada (aquela placa com menor número de colônias, a qual permitia a contagem com mais eficiência). Assim, o número de colônias foi contado manualmente.
- e) O número de colônias contado foi multiplicado pela diluição correspondente, depois dividido por 10 (que representam os 10 μL que foram plaqueados) e por último multiplicado por 1000, para obtenção de UFC/mL.
- f) Depois disso, uma curva de crescimento foi construída para cada um dos ensaios realizados (sinergia, daptomicina, LP9666 e controle de crescimento), através da disposição do log de UFC/mL *versus* o tempo (em horas).

9.3. Resultados

9.3.1. Teste de sensibilidade à daptomicina

As Tabelas 64, 65, 66 e 67 apresentam os valores de CIM encontrados para a daptomicina e ampicilina sódica em relação ao *S. aureus*, MRSA, *S. pneumoniae* e VRE, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 64- Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) encontrados para a daptomicina e ampicilina sódica (controle do método) quando testadas contra 13 cepas de *S. aureus*

Cepa	Daptomicina ¹		Ampicilina sódica (controle)	
	1	2	1	2
<i>S. aureus</i> JL	0,5	0,5	> 16,0	> 16,0
<i>S. aureus</i> ATCC 49775	0,5	0,5	0,25	0,25
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ²	0,5	0,5	2,0	2,0
<i>S. aureus</i> T6-47	> 16,0	> 16,0	> 16,0	> 16,0
<i>S. aureus</i> T6-133	0,5	0,5	> 16,0	> 16,0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,5	0,5	0,125	0,125
<i>S. aureus</i> T7-A6	0,5	0,5	> 16,0	> 16,0
<i>S. aureus</i> WT	0,5	0,5	16,0	16,0
<i>S. aureus</i> 308	2,0	2,0	1,0	1,00
<i>S. aureus</i> ATCC 63580	0,25	0,5	0,125	0,125
<i>S. aureus</i> ATCC 29312	0,25	0,25	1,0	1,0
<i>S. aureus</i> B313	0,25	0,25	0,0625	0,125
<i>S. aureus</i> DW	0,25	0,25	> 16,0	> 16,0

¹ Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

² *S. aureus* ATCC 29312 foi usado como micro-organismo controle.

Tabela 65- Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) encontrados para a daptomicina e ampicilina sódica (controle do método) quando testadas contra 26 cepas de MRSA

Cepa	Daptomicina ¹		Ampicilina sódica (controle)	
	1	2	1	2
MRSA 8365	0,5	0,5	0,125	0,125
MRSA 4300	0,250	0,25	> 16,0	> 16,0
MRSA (<i>classic</i>)	0,5	0,5	0,125	0,125
MRSA (VSA 300)	0,250	0,25	> 16,0	> 16,0
MRSA 580	0,5	0,5	> 16,0	> 16,0
MRSA 610	0,5	0,5	> 16,0	> 16,0
MRSA 372	1,0	1,0	> 16,0	> 16,0
MRSA WA 1 (ST1)	0,5	0,5	> 16,0	> 16,0
MRSA WA 2 (ST78)	0,5	0,5	> 16,0	> 16,0
MRSA WA 3 (ST5)	0,5	0,5	> 16,0	> 16,0
MRSA WA 84 (ST45)	0,5	0,5	> 16,0	> 16,0
MRSA QLD PVL ⁺ (ST93)	0,250	0,25	> 16,0	> 16,0
MRSA AUS 2 (ST)	1,0	1,0	> 16,0	> 16,0
MRSA AUS 3 (ST)	0,5	0,5	> 16,0	> 16,0
MRSA BENGAL BAY PVL ⁺ (ST772)	8,0	8,0	0,5	0,5
EMRSA IRISH 1 (ST8)	0,5	0,5	>16,0	> 16,0
EMRSA IRISH 2 (ST)	0,5	0,5	>16,0	> 16,0
EMRSA UK 15 (ST22)	0,5	0,5	>16,0	> 16,0
EMRSA UK 15 PVL ⁺ HA (ST22)	0,5	0,5	16,0	16,0
EMRSA UK 16 (ST36)	0,5	0,5	>16,0	> 16,0
EMRSA UK 17 (ST247)	0,5	0,5	>16,0	> 16,0
cMRSA TAIWAN PVL ⁺ (ST59)	0,5	0,5	8,0	8,0
MRSA NY JAPAN (ST5)	0,5	0,5	>16,0	>16,0
MRSA WSPP (ST30)	0,5	0,5	>16,0	>16,0
MRSA USA 300 (ST8)	0,5	0,5	>16,0	>16,0
MRSA-V ST 398 (ST398)	0,5	0,5	>16,0	>16,0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ²	0,5	0,5	2,0	2,0

¹ Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

² *S. aureus* ATCC 29213 foi usado como micro-organismo controle.

Tabela 66- Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) encontrados para a daptomicina e ampicilina sódica (controle do método) quando testadas contra 20 cepas de *S. pneumoniae*

Cepa	Daptomicina ¹		Ampicilina sódica (controle)	
	1	2	1	2
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6303 ²	0,25	0,25	0,125	0,125
<i>S. pneumoniae</i> P21	0,25	0,25	0,06	0,06
<i>S. pneumoniae</i> WCH184	0,25	0,25	0,125	0,125
<i>S. pneumoniae</i> WCH77	0,5	0,5	0,5	2,0
<i>S. pneumoniae</i> L82016	0,25	0,25	0,06	0,06
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	0,25	0,25	0,125	0,125
<i>S. pneumoniae</i> WCH43	0,25	0,25	0,125	0,125
<i>S. pneumoniae</i> WCH89	0,5	0,5	0,125	0,125
<i>S. pneumoniae</i> WCH16	0,25	0,25	1,0	0,5
<i>S. pneumoniae</i> D39	1,0	1,0	0,125	0,125
<i>S. pneumoniae</i> WCH 57	0,25	0,25	0,0312	0,0312
<i>S. pneumoniae</i> WCH 158	0,125	0,125	0,0312	0,0312
<i>S. pneumoniae</i> P9	0,25	0,25	0,0312	0,0312
<i>S. pneumoniae</i> WCH 86	0,125	0,125	0,0312	0,0312
<i>S. pneumoniae</i> WCH 137	0,125	0,125	0,0312	0,0312
<i>S. pneumoniae</i> WCH 46	0,125	0,125	0,0312	0,0312
<i>S. pneumoniae</i> WCH 211	0,25	0,25	0,0312	0,0312
<i>S. pneumoniae</i> WU 2	0,125	0,125	0,0312	0,0312
<i>S. pneumoniae</i> A 66.1	0,25	0,25	0,0312	0,0312
<i>S. pneumoniae</i> WCH 92	0,125	0,125	0,0312	0,0312

¹ Todos os experimentos foram realizados em duplicata.² *S. pneumoniae* ATCC 6303 foi usado como micro-organismo controle.

Tabela 67- Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) encontrados para a daptomicina e ampicilina sódica (controle do método) quando testadas contra 20 cepas de VRE

Cepa	Daptomicina ¹		Ampicilina sódica (controle)	
	1	2	1	2
VRE G9W	0,25	0,25	1,0	1,0
VRE 70 W	0,25	0,25	1,0	1,0
VRE 78 W	1,0	1,0	1,0	1,0
VRE 45 FR	2,0	2,0	2,0	2,0
VRE 49 FR	4,0	4,0	2,0	2,0
VRE 53 FR	4,0	4,0	1,0	1,0
VRE 55 FR	2,0	2,0	1,0	1,0
VRE 57 FR	4,0	4,0	1,0	1,0
VRE 58 FR	2,0	2,0	1,0	1,0
VRE 59 FR	4,0	4,0	2,0	2,0
VRE 61 FR	2,0	2,0	1,0	1,0
VRE 62 FR	4,0	4,0	2,0	2,0
VRE 284G	0,5	0,5	2,0	2,0
VRE 290G	1,0	1,0	1,0	1,0
VRE 60FR	4,0	4,0	1,0	1,0
VRE 251G	1,0	1,0	1,0	1,0
VRE 252G	0,25	0,25	0,5	0,5
VRE 257G	0,5	0,5	1,0	1,0
VRE 270G	0,125	0,125	0,125	0,125
VRE 277G	0,5	0,5	2,0	2,0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 ²	2,0	2,0	2,0	2,0

¹ Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

² *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi usado como controle.

9.3.2. Ensaios preliminares de sinergia

9.3.2.1. Checkerboard

Na primeira etapa do experimento, combinações individuais entre daptomicina + LP9666, daptomicina + NCL 195 e daptomicina + NCL 219 foram realizadas e testadas contra selecionadas cepas de MRSA. As Tabelas 68, 69 e 70 mostram os resultados de MIC obtidos com estas combinações.

Na segunda etapa, sinergia entre daptomicina + LP9666 + NCL 195 foi avaliada. A Tabela 71 mostra os resultados.

Tabela 68- CIM para daptomicina e LP9666 antes e depois do ensaio de sinergia

Cepa	CIM ¹ para daptomicina (µg/mL)	CIM para daptomicina (µg/mL) após a combinação com LP9666	CIM para LP9666 (µg/mL)	CIM para LP9666 (µg/mL) após a combinação com daptomicina	ICIF/ Efeito ²
MRSA 8365	0,5	0,5	4,0	4,0	2,00/ Indiferente
MRSA 4300	0,25	0,25	4,0	2,0	1,50/ Indiferente
MRSA (<i>classic</i>)	0,5	0,5	4,0	4,0	2,00/ Indiferente
MRSA (VSA 300)	0,25	0,25	4,0	2,0	1,50/ Indiferente
MRSA 580	0,5	0,25	4,0	2,0	1,00/ Aditivo
MRSA 610	0,5	0,25	4,0	2,0	1,00/ Aditivo

¹ Todos os resultados de CIM descritos nesta tabela foram obtidos em triplicata.

² Valores de ICIF calculados de acordo com a Equação 22 e efeitos definidos de acordo com Tabela 63.

Tabela 69- CIM para daptomicina e NCL 219 antes e depois do ensaio de sinergia

Cepa	CIM ¹ para daptomicina (µg/mL)	CIM para daptomicina (µg/mL) após a combinação com NCL 219	CIM para NCL 219 (µg/mL)	CIM para NCL 219 (µg/mL) após a combinação com daptomicina	ICIF/ Efeito ²
MRSA 8365	0,5	0,5	8,0	2,0	1,25/ Indiferente
MRSA 4300	0,5	0,5	4,0	2,0	1,50/ Indiferente
MRSA (<i>classic</i>)	1,0	0,5	4,0	2,0	0,50/ Aditivo
MRSA (VSA 300)	1,0	1,0	> 8,0	4,0	*
MRSA 580	0,5	0,5	4,0	4,0	2,00/ Indiferente
MRSA 610	0,5	0,5	> 8,0	2,0	*

¹ Todos os resultados de CIM descritos nesta tabela foram obtidos em triplicata.

² Valores de ICIF calculados de acordo com a Equação 22 e efeitos definidos de acordo com Tabela 63.

*Não foi possível calcular o ICIF.

Tabela 70- CIM para daptomicina e NCL 195 antes e depois do ensaio de sinergia

Cepa	CIM ¹ para daptomicina (µg/mL)	CIM para daptomicina (µg/mL)		CIM para NCL 195 (µg/mL)		ICIF/ Efeito ²
		após a combinação com NCL 195	CIM para NCL 195 (µg/mL)	CIM para NCL 195 (µg/mL)	CIM para NCL 195 (µg/mL) após a combinação com daptomicina	
MRSA 8365	0,5	0,25	2,0	2,0	1,0	1,00/ Aditivo
MRSA 4300	0,5	0,25	2,0	2,0	1,0	1,00/ Aditivo
MRSA (<i>classic</i>)	1,0	0,5	2,0	2,0	2,0	1,50/ Indiferente
MRSA (VSA 300)	1,0	0,5	2,0	2,0	2,0	1,50/ Indiferente
MRSA 580	0,25	0,25	2,0	2,0	1,0	1,50/ Indiferente
MRSA 610	0,5	0,25	2,0	2,0	1,0	1,00/ Aditivo

¹ Todos os resultados de CIM descritos nesta tabela foram obtidos em triplicata.

² Valores de ICIF calculados de acordo com a Equação 22 e efeitos definidos de acordo com Tabela 63.

Tabela 71- CIM ($\mu\text{g/mL}$) para daptomicina, LP9666 e NCL 195 antes e depois do ensaio de sinergia

CEPA	CIM ¹ para DPT ² ($\mu\text{g/mL}$)	CIM para LP9666 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM para NCL 195 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM para DPT + LP9666 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM para DPT + NCL 195 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM para LP9666 + NCL 195 ($\mu\text{g/mL}$)	CIM para DPT + LP9666 + NCL 195 ($\mu\text{g/mL}$)	ICIF/ Efeito ³
MRSA 8365	0,25	2,0	2,0	0,25 e 2,0	0,25 e 1,0	1,0 e 0,5	0,125; 1,0 e 0,5	1,25/ Indiferente
MRSA 4300	0,25	2,0	2,0	0,25 e 2,0	0,25 e 1,0	1,0 e 0,5	0,125; 1,0 e 0,5	1,25/ Indiferente
MRSA (<i>classic</i>)	0,5	2,0	2,0	0,25 e 2,0	0,25 e 1,0	2,0 e 1,0	0,25; 2,0 e 1,0	2,00/ Indiferente
MRSA (VSA 300)	0,5	2,0	1,0	0,25 e 2,0	0,25 e 1,0	1,0 e 0,5	0,125; 1,0 e 0,5	1,25/ Indiferente
MRSA 580	0,25	2,0	2,0	0,25 e 2,0	0,25 e 1,0	1,0 e 0,5	0,125; 1,0 e 0,5	1,25/ Indiferente
MRSA 610	0,25	1,0	2,0	0,125 e 1,0	0,25 e 1,0	1,0 e 0,5	0,125; 1,0 e 0,5	1,75/ Indiferente

¹ Todos os resultados de CIM descritos nesta tabela foram obtidos em triplicata.

² DPT: daptomicina.

³ Valores de ICIF calculados de acordo com a Equação 23 e efeitos definidos de acordo com Tabela 63.

9.3.2.2. Time-Kill

9.3.2.2.1. Definição das concentrações de trabalho

Os valores de CIM da daptomicina e LP9666 foram verificados antes e depois de serem combinados. O índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) também foi calculado. A Tabela 72 apresenta os resultados obtidos. A CIM apresentada pela ampicilina, utilizada como controle, foi de 0,078 µg/mL.

Tabela 72- CIM (µg/mL) para daptomicina e LP9666 antes e depois da combinação, frente ao *S. aureus* ATCC 25923

Micro-organismo	Antimicrobiano	CIM (µg/mL) ¹		ICIF/ Efeito ²
		Antes da combinação	Depois da combinação	
<i>S. aureus</i>	Daptomicina	0,0625	0,0625	1,25/ Indiferente
ATCC 25923	LP9666	0,25	0,0625	

¹ Todos os resultados de CIM descritos nesta tabela foram obtidos em triplicata

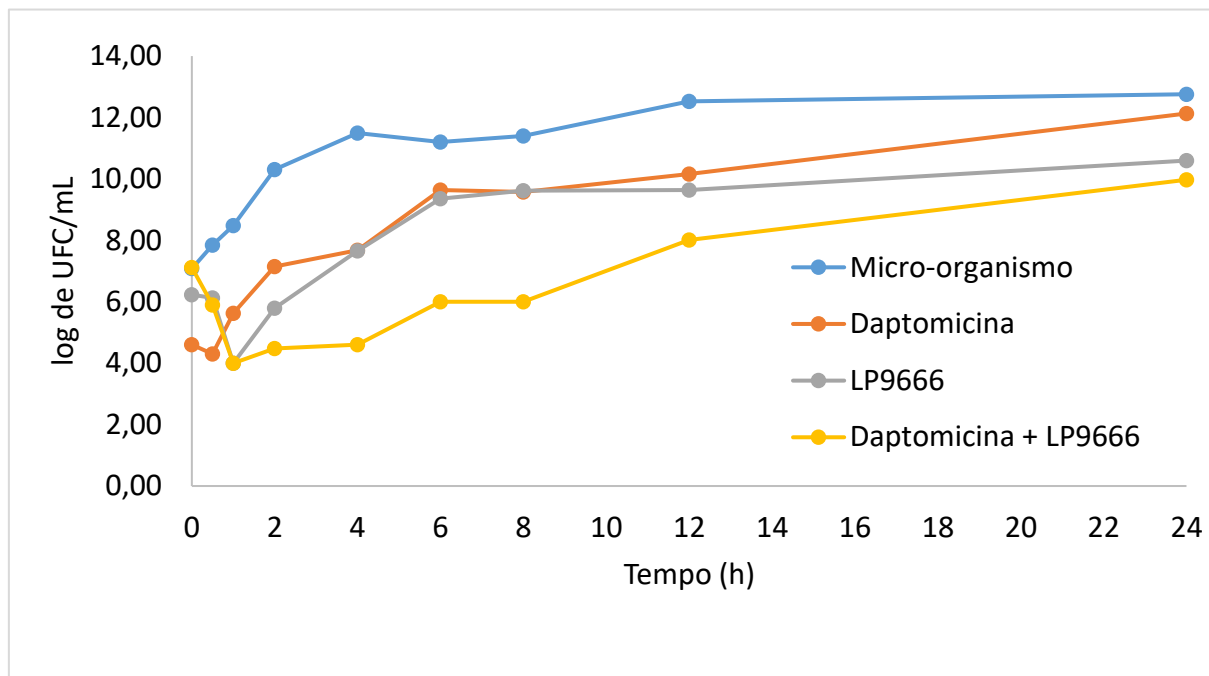
² Valor de ICIF calculado de acordo com a Equação 22 e efeito definido de acordo com Tabela 63.

Após a combinação entre a daptomicina e o LP9666, o valor de CIM verificado para ambos foi de 0,0625 µg/mL. Desta forma, a concentração de trabalho definida para o ensaio de *Time-Kill* foi de 0,125 µg/mL, que representa duas vezes os valores de CIM, para os dois antimicrobianos.

9.3.2.2.2. Resultados do método de Time-Kill

A Figura 46 apresenta uma sobreposição das curvas que representam as atividades antimicrobianas da daptomicina, do LP9666 e da combinação entre eles, frente ao *S. aureus* ATCC 25923. Também mostra o controle de crescimento desta bactéria, para fins comparativos.

Figura 46- Curvas representativas das atividades antimicrobianas da daptomicina (0,125 µg/mL), do LP9666 (0,125 µg/mL) e da combinação entre eles (0,125 µg/mL cada), frente a *S. aureus* ATCC 25923 (em relação ao controle de crescimento).



9.4. Discussão

9.4.1. Teste de sensibilidade à daptomicina

Considerando a existência de relatos na literatura de resistência bacteriana à daptomicina e também a importância deste antimicrobiano para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas resistentes, um teste de sensibilidade à daptomicina foi realizado, a fim de verificar a sensibilidade de quatro bactérias (*Staphylococcus aureus*, MRSA, *Streptococcus pneumoniae* e VRE) em relação a este antimicrobiano.

De acordo com o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), a CIM da daptomicina para cepas suscetíveis de *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. dos grupos A, B, C e G é de ≤ 1 µg/mL. Portanto, estas bactérias são consideradas resistentes quando apresentam valores de CIM superiores a 1 µg/mL, embora isto seja raro. O mesmo comitê alega não ter evidências suficientes para afirmar que *Enterococcus* sp. é um bom alvo para terapia com este antimicrobiano, não apresentando, portanto, valores de CIM como referência para cepas resistentes ou suscetíveis (EUCAST, 2014). No entanto, segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), o valor de

CIM para cepas suscetíveis de *Enterococcus* sp. é de ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$, sendo que valores maiores que este são atribuídos a cepas resistentes (CLSI, 2012).

No total, 79 cepas foram testadas. Entre elas, 39 cepas foram de *Staphylococcus aureus*, das quais 26 eram resistentes à meticilina (MRSA) e 13 eram suscetíveis. Entre as cepas suscetíveis à meticilina (Tabela 64), 15% mostraram-se resistentes à daptomicina, com valores de CIM $\geq 1,0$ $\mu\text{g/mL}$. Quanto às cepas de resistentes à meticilina (MRSA) (Tabela 65), 100% mostraram-se sensíveis à daptomicina. Alguns trabalhos descritos na literatura também mostram a ocorrência (pronunciada ou não) de cepas de *S. aureus* resistentes a este antimicrobiano (FOWLER et al., 2006; MALLI et al., 2008; SHARMA et al., 2008).

Embora também existam alguns relatos de MRSA resistentes à daptomicina, este estudo não detectou nenhum caso (SKIEST, 2006; GASCH et al., 2014). Este resultado corrobora dados encontrados na literatura, onde vários artigos mostram a eficácia da daptomicina no tratamento de infecções causadas por MRSA (DIEDEREN et al., 2006; TRACZEWSKI et al., 2008; SADER; MOET; JONES, 2009a; SADER; MOET; JONES, 2009b; MURILLO et al., 2009; ENTENZA et al., 2010; POEPPL et al., 2011; LUCHTING et al., 2013; CHITNIS et al., 2013).

Os mecanismos pelos quais as bactérias se tornam resistentes à daptomicina não estão totalmente elucidados. No entanto, alguns autores observaram que um espessamento da parede celular bacteriana é uma característica comum em cepas de *S. aureus* resistentes à daptomicina, embora o mecanismo que leva a este fenótipo permaneça desconhecido. Bertsche e colaboradores (2011) analisaram cepas de *S. aureus* resistentes à daptomicina quanto à composição da sua parede celular e perceberam que o grau de ligações cruzadas e de precursores de peptidoglicano é o mesmo em bactérias suscetíveis e não-suscetíveis; no entanto, notaram que as bactérias não-suscetíveis apresentaram menor concentração de peptidoglicano *O*-acetilado e sintetizaram significativamente mais ácido teicoico. Também perceberam aumento na expressão dos genes *tagA* e *dltA* e aumento na carga superficial positiva, fatores que podem estar envolvidos na ocorrência do fenótipo citado.

Vinte cepas de *Streptococcus pneumoniae* também foram analisadas quanto à sua atividade em relação à daptomicina (Tabela 66). Todas elas mostraram-se sensíveis a este antimicrobiano. Este resultado complementa estudo publicado por Cottagnoud e colaboradores (2004), em que se observou que a daptomicina apresenta adequada penetração em meninges inflamadas e pronunciada eficácia contra pneumococos resistentes à penicilina e

a quinolonas, e estas características qualificam este fármaco como um candidato em potencial para o tratamento da meningite pneumocócica no futuro.

Por último, 20 cepas de VRE também foram testadas contra este lipopeptídeo cíclico, e não se observou resistência em nenhum caso (Tabela 67). Este fato é uma evidência de que a daptomicina ainda é uma opção eficiente para o tratamento de infecções causadas por VRE, corroborando outros estudos publicados a este respeito (SADER; MOET; JONES, 2009a; DHAWAN; GADEPALLI; KAPIL, 2009; BELL et al., 2010; KING et al., 2011; EDEN et al., 2012; LUCHTING et al., 2013; CHITNIS et al., 2013).

Considerando o número de cepas testadas neste trabalho, um estudo mais aprofundado é necessário para apoiar os resultados obtidos. No entanto, estes resultados representam um alerta em relação à ocorrência de cepas de *S. aureus* resistentes a este importante antimicrobiano.

9.4.2. Ensaios preliminares de sinergia

Estudos de sinergia são importantes, tanto para aumentar o espectro de atividade de um antimicrobiano quanto para reduzir o desenvolvimento de resistência, a qual representa um sério problema global. Neste contexto, a busca por alternativas terapêuticas para o combate de micro-organismos resistentes é essencial.

Assim, o objetivo desta etapa do trabalho foi a realização de um estudo preliminar para avaliar a sinergia entre a daptomicina e outros agentes antimicrobianos que são objetos de estudo do grupo de pesquisa onde este trabalho foi realizado, na UniSA (Adelaide, Austrália). Os antimicrobianos testados com a daptomicina foram os seguintes: LP9666, NCL 195 e NCL 219. Estes fármacos estão sob Proteção da Propriedade Intelectual e nenhuma outra informação sobre eles foi divulgada pelo grupo de pesquisa do Prof. Sanjay Garg.

Combinações entre estes antimicrobianos foram testadas contra seis cepas de MRSA. A escolha do MRSA para ser utilizado neste estudo veio do fato do tratamento de infecções causadas por estas bactérias representarem verdadeiros desafios para a medicina. Além disso, apesar de a daptomicina ser um importante fármaco utilizado para esta finalidade, já existem relatos de resistência bacteriana (SKIEST, 2006; GASCH et al., 2014).

Na primeira etapa do trabalho, combinações individuais entre a daptomicina e cada um dos outros antimicrobianos foram realizadas. A Tabela 68 apresenta os resultados encontrados com a combinação da daptomicina com o LP9666. Através da análise dos índices de concentrações inibitórias fracionadas (ICIF), foi possível observar que para MRSA 8365,

4300, *classic* e VSA 300, não houve efeito sinérgico, já que a interação entre os antimicrobianos foi considerada indiferente. Por outro lado, efeitos aditivos foram notados para MRSA 580 e 610.

A Tabela 69 apresenta os resultados obtidos através da combinação de daptomicina com NCL 219. Os valores de CIM para NCL 219 foram relativamente altos ($\geq 4,0$ µg/mL). A combinação entre os antimicrobianos foi considerada indiferente para a maioria das cepas testadas (MRSA 8365, 4300 e 580). Não foi possível calcular o ICIF para MRSA (VSA 300) e 610, devido aos altos valores de CIM apresentados pelo NCL 219 antes da combinação. Apenas para o MRSA (*classic*), foi observado um efeito aditivo. Desta forma, o NCL 219 não foi considerado opção adequada para ser combinado com a daptomicina.

A Tabela 70 mostra os resultados obtidos através da combinação da daptomicina com o NCL 195. Efeitos aditivos foram observados para a metade das cepas testadas (MRSA 8365, 4300 e 610). Para as outras cepas, a interação entre os antimicrobianos foi considerada indiferente.

Desta forma, não foi observado efeito sinérgico para nenhuma combinação de antimicrobianos testada nesta primeira etapa do estudo. No entanto, efeito aditivo foi evidenciado em alguns casos, com destaque para as combinações de daptomicina com LP9666 e NCL 195, individualmente. Assim, em uma segunda etapa do estudo, sinergia entre estes três compostos foi verificada. A Tabela 71 mostra os resultados. É possível notar que mesmo após a tripla combinação, a interação entre os antimicrobianos foi considerada indiferente em todos os casos.

Com tudo isso, foi possível observar que combinações triplas entre a daptomicina, LP9666 e NCL 195 não geram efeito sinérgico em relação às cepas de MRSA testadas. Por outro lado, combinações da daptomicina tanto com o LP9666 quanto com o NCL 195 são promissoras e merecem estudos mais aprofundados, utilizando métodos oficiais, para confirmação dos dados obtidos. Lembrando que este estudo utilizou um método de *Checkerboard* não oficial, adaptado de método descrito por Pillai, Moellering e Eliopoulos (2005), para tornar possível a análise de mais de uma cepa por microplaca e agilizar o processo. O objetivo principal deste estudo foi rastrear possíveis alternativas para combater as estirpes resistentes de MRSA, para que no futuro estas combinações possam ser estudadas de maneira mais abrangente, através de métodos oficiais.

Existe um outro método também utilizado para avaliar a sinergia entre compostos, que é o *Time-Kill*. Este método avalia o tempo em que a substância-teste leva para matar as

células microbianas. Uma das vantagens deste método em relação ao *Checkerboard* é que ele fornece a dinâmica da ação da substância-teste e sua interação com o tempo (MITCHELL et al., 2012). Assim, considerando as vantagens que o método de *Time-Kill* oferece, ele também foi utilizado para avaliar a sinergia entre a daptomicina e o LP9666 em relação à cepa padrão, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Este estudo foi realizado com apoio do grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Taís Maria Bauab, da FCF-UNESP.

O *S. aureus* ATCC 25923 foi escolhido para o estudo por se tratar de uma cepa padrão. Não foi possível realizar os ensaios com as cepas de MRSA utilizadas no método de *Checkerboard* descrito anteriormente, realizado na UniSA (Adelaide, Austrália), já que se tratavam de cepas clínicas, que não estão disponíveis no Brasil. Desta forma, foi escolhida uma cepa de *S. aureus* como micro-organismo-teste para o ensaio de *Time-Kill*.

Para a realização do ensaio de *Time-Kill*, primeiramente foi feito um ensaio *Checkerboard*, para a definição das concentrações dos antimicrobianos a serem testadas no ensaio *Time-Kill*. Neste ensaio, a daptomicina e o LP9666 foram testados isoladamente e também em combinação, frente ao *S. aureus* ATCC 25923, para a definição das respectivas CIMs. As concentrações testadas no *Time-Kill* foram duas vezes as CIMs obtidas após a combinação entre os antimicrobianos. Como foi verificado que a CIM após a combinação entre eles foi de 0,0625 µg/mL (para ambos), a concentração testada no ensaio *Time-Kill* foi de 0,125 µg/mL, para a daptomicina e LP9666.

Quanto ao ensaio *Time-Kill*, a Figura 46 apresenta uma sobreposição das curvas de morte que representam as atividades antimicrobianas da daptomicina, do LP9666 e da combinação entre eles, frente ao *S. aureus* ATCC 25923. Através desta figura, é possível observar que evidentemente houve sinergia entre a daptomicina e o LP9666, já que a curva que representa a combinação entre eles (de cor amarela) apresenta-se abaixo das curvas obtidas com a daptomicina (de cor laranja) e o LP9666 (de cor cinza). Isto significa que o número de células viáveis após a utilização da combinação de antimicrobianos foi significativamente inferior aos números encontrados quando cada um deles foi usado isoladamente, mostrando a maior eficiência da combinação. O efeito sinérgico começou a ser notado após 2 horas de teste, quando o número de células viáveis começou a se mostrar inferior ao apresentado pela daptomicina e pelo LP9666, e este perfil se manteve até o final do ensaio (24,0 horas), ou seja, o efeito sinérgico se prolongou até a última análise. No entanto, a combinação foi a que mais demorou a apresentar atividade antimicrobiana.

Quanto ao perfil da daptomicina, foi notado que embora sua atividade tenha sido a mais rápida de todas, o fármaco mostrou-se menos ativo ao longo do tempo em relação ao LP9666 e à combinação. Nos tempos 0,0 e 0,5 hora, sua atividade antimicrobiana foi mais pronunciada, no entanto, após 1,0 hora, houve aumento gradual no número de células, que se manteve superior ao encontrado para o LP9666 e para a combinação até a 24^a hora de ensaio. Apesar disso, após 24,0 horas, a daptomicina ainda se mostrava ativa contra o *S. aureus*, já que o número de células permanecia abaixo do controle de crescimento. Este é um fator positivo, já que a administração de uma única dose diária é o recomendado para este antimicrobiano.

O LP9666, por sua vez, mostrou-se menos ativo que a daptomicina no início do ensaio (até 30 minutos), mas logo depois apresentou uma queda brusca do número de células viáveis (em 1,0 h) e manteve-se assim até o final do ensaio. Este mesmo perfil também foi observado para a combinação de antimicrobianos, que do mesmo modo apresentou uma queda brusca do número de células viáveis no mesmo tempo que o LP9666. O perfil da curva de morte apresentada pelo LP9666 se mostrou muito parecido com o apresentado pela combinação, embora o LP9999 tenha sido menos ativo durante quase todo o tempo (de 0,5 a 24,0 horas). Assim, talvez o efeito sinérgico tenha sido decorrente, em maior parte, da atividade do LP9666 do que da daptomicina. Este perfil também foi observado no ensaio *Checkerboard* (Tabela 72), que mostrou que depois da combinação, a CIM para o LP9666 reduziu, enquanto para a daptomicina permaneceu a mesma.

Também foi possível notar que tanto para a daptomicina, quanto para o LP9666 e para a combinação entre eles, as curvas de morte apresentadas permaneceram abaixo da curva do controle de crescimento até a última análise do ensaio, mostrando que ainda havia alguma atividade antimicrobiana até 24,0 horas. A combinação foi a que mostrou atividade antimicrobiana mais pronunciada, seguida pelo LP9666 e por último a daptomicina.

Por outro lado, sinergia não foi observada no ensaio de *Checkerboard*, em relação ao *S. aureus* ATCC 25923, o qual mostrou que a combinação entre os antimicrobianos é indiferente (Tabela 72). Este resultado pode ter ocorrido em decorrência do modo de revelação empregado, utilizando solução de resazurina. A resazurina vem sendo utilizada há mais de 50 anos para o monitoramento de contaminação microbiológica. Este corante, que é azul e não fluorescente, é reduzido para resorufina, que é rosa e altamente fluorescente, na presença de células bacterianas. Ainda não se sabe como esta redução ocorre, se é intracelularmente através de atividade enzimática ou por meio de uma reação química,

embora a forma fluorescente reduzida da resazurina tenha sido encontrada em células vivas e mortas (O'BRIEN et al., 2000). Desta forma, é possível que a resazurina tenha revelado bactérias não viáveis no ensaio de *Checkerboard*, e isto pode explicar a diferença no resultado em relação ao ensaio *Time-Kill*. Isto mostra a importância da realização de ensaios de *Time-Kill* para estudos de sinergia.

Assim, o estudo de *Time-Kill* realizado mostra que provavelmente há efeito sinérgico entre a daptomicina e o LP9666 em relação ao *S. aureus* ATCC 25923. No entanto, estudos mais aprofundados a este respeito devem ser realizados.

10. DISCUSSÃO GERAL

A monitorização da qualidade de produtos farmacêuticos é uma prática fundamental para a saúde da população. Qualquer serviço de saúde pode ser gravemente comprometido caso os medicamentos disponíveis para os usuários não atendam aos padrões aceitáveis de qualidade, segurança e eficácia. Esta importância torna-se ainda mais evidente quando pensamos na qualidade dos antimicrobianos utilizados na prática clínica. Segundo o Relatório Global de Vigilância em Resistência Antimicrobiana, publicado pela OMS em 2014, a resistência aos antimicrobianos não é mais uma previsão para o futuro, já que está acontecendo neste momento, em todo o mundo, e colocando em risco a capacidade dos sistemas de saúde de tratar infecções comuns adquiridas na comunidade e hospitais. Neste contexto, antimicrobianos de má qualidade podem contribuir para o agravamento deste quadro, e por isso a qualidade destes produtos deve ser rigorosamente controlada.

O fármaco estudado neste trabalho foi a daptomicina, na forma farmacêutica de pó liofilizado (para solução injetável), a qual é prescrita em mais de 40 países. Trata-se de um antimicrobiano fundamental para a prática clínica nos dias de hoje, já que vem sendo utilizado com sucesso para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas resistentes, tais como MRSA, VRE e VRSA, as quais são consideradas desafios para a Medicina.

Um dos objetivos deste trabalho foi o desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos e quantitativos para a análise da daptomicina. Revisão da literatura mostrou que embora haja alguns métodos analíticos descritos na literatura para análise deste fármaco, havia a necessidade do desenvolvimento de metodologias otimizadas, considerando a minimização do uso de solventes orgânicos ou a utilização de solventes menos tóxicos para os operadores, além de métodos mais práticos e rápidos, principalmente para a análise da daptomicina na forma farmacêutica, para a qual existem menos métodos publicados.

O desenvolvimento de métodos analíticos eficazes para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados é de extrema importância, uma vez que dados analíticos não confiáveis podem causar grandes problemas, tanto para a saúde da população, quanto financeiros para a indústria farmacêutica que o produz. Assim, a etapa de validação é indispensável para a apresentação de um método analítico à comunidade científica, já que assegura a confiabilidade dos dados analíticos gerados (LA ROCA et al., 2007).

Quanto à análise qualitativa, foram desenvolvidos os seguintes métodos: CCD, espectrofotometria nas regiões do UV e infravermelho, CLAE e EC. A RDC nº 899 de 2003

(BRASIL, 2003) e os guias de validação do ICH (ICH, 2005) exigem a comprovação de apenas um parâmetro para a validação de métodos qualitativos (Categoria IV), que é a seletividade. Desta forma, a seletividade foi comprovada para todos os métodos desenvolvidos, já que não houve interferência do excipiente e/ou de produtos de degradação na análise da daptomicina em nenhum caso.

Entre os métodos qualitativos desenvolvidos, apenas a CCD e a CLAE utilizam solventes orgânicos para suas análises. No entanto, o solvente orgânico proposto para o método de CLAE é o etanol, considerado menos tóxico para o meio ambiente e operadores do que outros solventes mais comumente utilizados para análises cromatográficas, que são o metanol e a acetonitrila. Por este motivo, o método de CLAE desenvolvido é ambientalmente favorável. Já o método de CCD emprega o metanol como fase orgânica de sua fase móvel, porém em quantidade mínima. No entanto, apresenta algumas vantagens em relação aos outros métodos propostos, já que não necessita de equipamentos ou solventes de alto custo para suas análises. Os demais métodos qualitativos propostos, quais sejam a espectrofotometria nas regiões do UV e infravermelho e a eletroforese capilar, não utilizam solventes orgânicos para suas análises, então são aqueles que melhor se enquadram nos parâmetros da Química Verde.

As espectrofotometrias nas regiões do UV e infravermelho permitiram detectar características de absorção específicas de daptomicina. Ao mesmo tempo, os métodos de CCD, CLAE e eletroforese capilar foram úteis na identificação deste antimicrobiano na forma farmacêutica quando comparado a um padrão analítico.

Na análise quantitativa foram desenvolvidos e validados cinco métodos, com características e custos diferentes: espectrofotometria nas regiões do UV e infravermelho, CLAE, ensaio microbiológico por turbidimetria e eletroforese capilar. A validação também foi realizada com base nos guias ICH (2005) e RDC nº 899 (BRASIL, 2003), os quais indicam os principais parâmetros a serem avaliados durante a validação de um método analítico, que são linearidade, precisão, exatidão, robustez e seletividade. Os limites de detecção e de quantificação, embora não sejam requisitos obrigatórios, também foram estimados para os métodos físico-químicos propostos. Estes valores foram apenas estimados, com base em equações descritas na literatura, sendo necessária a realização de ensaios para a confirmação dos valores teóricos calculados. Para o propósito deste trabalho, os valores estimados são suficientes, já que não se trata de parâmetros obrigatórios.

Em se tratando da validação dos métodos quantitativos, foi possível verificar que todos eles apresentaram linearidade adequada, com coeficientes de correlação (r) superiores a 0,999, o que foi confirmado através da análise de variância dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas. Os valores encontrados para a precisão dos cinco métodos foram considerados adequados, pois todos apresentaram DPR inferiores a 5%, como o recomendado pela legislação brasileira, já que o ICH não apresenta valor de referência para este parâmetro. Com relação à exatidão, os cinco métodos apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que todos os valores obtidos ficaram próximos a 100%.

Todos se mostraram também robustos para os parâmetros testados (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Modelo fatorial de Plackett-Burman, baseado em uma matriz de 15 experimentos, foi utilizado para comprovar a robustez dos métodos de CLAE e eletroforese capilar. Os métodos de CLAE e eletroforese capilar também se destacam por serem indicativos de estabilidade. Quanto à seletividade, todos se mostraram seletivos, já que não houve nenhuma interferência de excipiente e/ou produtos de degradação nas análises.

Para o desenvolvimento destes métodos, houve a preocupação de se minimizar ou eliminar o uso de solventes orgânicos, já que esta é uma prática que deve ser seguida cada mais pelos laboratórios químicos e farmacêuticos com objetivo de minimizar os impactos de suas atividades sobre o meio ambiente. Na CLAE, optou-se por solvente de baixa toxicidade ambiental e ocupacional, que é o etanol. Embora o método turbidimétrico utilize um pequeno volume de formaldeído no final de cada experimento, este volume é muito baixo em relação ao empregado em métodos cromatográficos, por exemplo. Já os outros métodos propostos não utilizam solventes orgânicos.

Normalmente, métodos de CLAE empregam um grande volume de solventes orgânicos para suas análises. Trabalho realizado por Welch e colaboradores (2010) previu a quantidade de resíduos químicos que um método de CLAE pode gerar em uma empresa farmacêutica. Para isso, eles consideraram uma coluna analítica de 4,6 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento, com vazão de cerca de 1,0-1,5 mL/min. Os autores concluíram que cada equipamento de CLAE em atividade pode gerar, diariamente, mais de 1,0 L de efluente (volume superior a 50 mL por análise), que deve ser eliminado como resíduo químico. Esta informação tem ainda maior impacto quando efeito cumulativo é considerado, uma vez que grandes empresas farmacêuticas podem ter centenas de cromatógrafos em atividade ao mesmo tempo. No entanto, o método de CLAE proposto neste

trabalho utiliza apenas 4,8 mL de fase móvel por análise, dos quais apenas 55% são constituídos por solvente orgânico (a outra parte é água).

Todos os métodos propostos são relativamente rápidos, o que é muito importante para análises de rotina do Controle de Qualidade de uma indústria farmacêutica. A exceção é o método turbidimétrico, que demanda maior tempo de execução que os métodos físico-químicos, embora este tempo seja reduzido em relação a outros métodos microbiológicos descritos na literatura para análise de antimicrobianos, tal como o método de difusão em ágar. Por outro lado, os métodos microbiológicos fornecem informações importantes sobre a potência de antimicrobianos, as quais não são fornecidas por métodos físico-químicos. Por isso, a combinação de métodos microbiológicos e físico-químicos é extremamente importante para análise de antimicrobianos.

Outras características de cada método proposto neste trabalho foram discutidas detalhadamente na seção “Análise comparativa dos métodos propostos” (seção nº 7) e por isso não serão discutidas novamente. Nesta seção, também foi demonstrado que todos os métodos propostos são intercambiáveis.

Outro objetivo deste trabalho foi a realização de estudos de estabilidade da daptomicina. Estudo de degradação forçada foi conduzido a fim de verificar o comportamento químico da molécula de daptomicina sob diferentes condições de estresse (ácida, alcalina, aquosa, oxidativa, térmica e diferentes valores de pH). A daptomicina em sua forma pura (SQR) foi escolhida para a realização do método, ao invés da forma farmacêutica, para evitar interferências do excipiente nas análises. Observou-se com este estudo que o fármaco é mais instável em condições alcalinas e mais estável em condições aquosas. O fármaco também demonstrou instabilidade em condições ácidas e oxidativas. Estas características devem ser levadas em consideração para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas contendo a daptomicina. Esta etapa foi realizada durante estágio sanduíche na UniSA (Adelaide, Austrália).

Também foram realizados estudos de estabilidade acelerado e de longa duração, mas com a daptomicina na forma farmacêutica de pó liofilizado. O objetivo foi a busca por evidências de como o teor de daptomicina na amostra de pó liofilizado varia com o tempo, sob uma variedade de fatores ambientais pré-definidos pela RE nº 1 de 2005 (BRASIL, 2005). A daptomicina manteve-se estável em todas as condições testadas visto que, estatisticamente, não houve redução do seu teor com o tempo. Isto mostra que as condições de armazenamento preconizadas pelo fabricante (2-8 °C) podem ser reanalisadas, já que o fármaco se manteve

íntegro mesmo em condições mais forçadas de armazenamento, durante o estudo de estabilidade acelerado.

Embora a daptomicina seja um fármaco utilizado com sucesso para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, já existem relatos de resistência a este antimicrobiano na literatura. Assim, na última etapa deste trabalho, um estudo microbiológico da daptomicina foi conduzido, também na UniSA (Adelaide, Austrália).

Na primeira etapa do estudo, um teste de sensibilidade à daptomicina foi realizado, a fim de verificar a sensibilidade de quatro bactérias (*S. aureus*, MRSA, *S. pneumoniae* e VRE) em relação a este antimicrobiano. Foi verificado que algumas cepas de *S. aureus* (15% das cepas testadas) apresentaram resistência à daptomicina. Alguns trabalhos descritos na literatura também mostram a ocorrência (pronunciada ou não) de cepas de *S. aureus* resistentes a este antimicrobiano (FOWLER et al., 2006; MALLI et al., 2008; SHARMA et al., 2008).

Quanto às outras bactérias testadas, todas mostraram-se sensíveis ao antimicrobiano, inclusive cepas de *S. pneumoniae*. Este resultado complementa estudo publicado por Cottagnoud et al. (2004), que mostrou que a daptomicina apresenta adequada penetração em meninges inflamadas e pronunciada eficácia contra pneumococos resistentes à penicilina e a quinolonas, e estas características qualificam este fármaco como um candidato em potencial para o tratamento da meningite pneumocócica no futuro.

Na segunda etapa do estudo microbiológico, foi realizado um estudo preliminar para avaliar a sinergia entre a daptomicina e outros agentes antimicrobianos que são objetos de estudo do grupo de pesquisa onde este trabalho foi realizado. Os antimicrobianos testados com a daptomicina foram os seguintes: LP9666, NCL 195 e NCL 219. Como estes fármacos estão sob Proteção da Propriedade Intelectual, nenhuma outra informação sobre eles foi divulgada. Foi observado que combinações entre a daptomicina, LP9666 e NCL 195 são promissoras e merecem estudos mais aprofundados. Estudos de sinergia são importantes, tanto para aumentar o espectro de atividade de um antimicrobiano quanto para reduzir o desenvolvimento de resistência.

Enfim, quanto ao desenvolvimento e validação de métodos analíticos, pode-se afirmar que todos os métodos propostos foram adequadamente validados e podem ser utilizados como opções práticas, econômicas e/ou ambientalmente favoráveis para a análise da daptomicina em pó liofilizado para solução injetável. Os estudos de estabilidade e microbiológico foram

importantes para gerar novos conhecimentos a respeito deste importante antimicrobiano e podem servir como base para novas pesquisas nesta área.

11. CONCLUSÕES

- No presente trabalho foi possível desenvolver e validar novos métodos analíticos para a determinação de daptomicina em amostras de pó liofilizado para solução injetável.
- As características qualitativas da daptomicina foram determinadas satisfatoriamente através da análise de suas características físicas e ponto de fusão.
- Foram desenvolvidos e validados cinco métodos para análise qualitativa da daptomicina, sendo eles a CCD, a espectrofotometria na região do UV, a CLAE, a eletroforese capilar e a espectrofotometria na região do IR, os quais se mostraram seletivos e adequados para auxiliar na identificação do fármaco no produto farmacêutico.
- Os métodos por CCD, CLAE e eletroforese capilar, além de serem adequados para a identificação do fármaco no produto farmacêutico, ainda possibilitaram a separação e detecção de produtos de degradação, mostrando suas capacidades indicativas de estabilidade.
- As análises quantitativas também permitiram desenvolver e validar cinco métodos analíticos para determinação de daptomicina em pó liofilizado para solução injetável, sendo eles a espectrofotometria na região do UV, o ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico, a CLAE, a eletroforese capilar e a espectrofotometria na região do IR. Os métodos desenvolvidos no presente trabalho mostraram-se lineares, precisos, exatos, seletivos e robustos. Além disso, são ambientalmente favoráveis.
- Os cinco métodos quantitativos mostraram-se apropriados para a quantificação da daptomicina em amostras de pó liofilizado para solução injetável, podendo ser usados como alternativas para análises do controle de qualidade deste fármaco.
- O ensaio microbiológico realizado através do método turbidimétrico se mostrou adequado para a determinação da potência da daptomicina no produto farmacêutico analisado.
- A análise estatística entre os métodos mostrou que eles são intercambiáveis, ou seja, são capazes de fornecer, estatisticamente, os mesmos resultados para a quantificação da daptomicina em amostras de pó liofilizado.

- O estudo de degradação forçada da daptomicina SQR mostrou que o fármaco é menos estável em condições alcalinas e mais estável em condições aquosas. O fármaco também demonstrou instabilidade, em menores proporções, em condições ácidas e oxidativas.
- As amostras de daptomicina em pó liofilizado se mostraram estáveis nas condições preconizadas tanto para o estudo de estabilidade acelerado quanto para o estudo de estabilidade de longa duração.
- A daptomicina demonstrou ser muito ativa contra MRSA, *S. pneumoniae* e VRE, embora resistência tenha sido encontrada para 15% das cepas de *S. aureus* (sensíveis à meticilina) estudadas.
- Em relação aos ensaios preliminares de sinergia, concluiu-se que as combinações entre daptomicina + LP9666 e daptomicina + NCL 195 são promissoras em relação a cepas de MRSA e merecem um estudo mais aprofundado a este respeito.
- O estudo de *Time-Kill* realizado mostrou que provavelmente há efeito sinérgico entre a daptomicina e o LP9666 em relação ao *S. aureus* ATCC 25923.
- Estes estudos foram fundamentais para gerar novos conhecimentos sobre este importante antimicrobiano e podem servir como base para novas pesquisas nesta área.

12. ARTIGOS PUBLICADOS E APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Os artigos científicos publicados até o momento estão descritos a seguir:

- 1) TÓTOLI, E.G.; GARG, S.; SALGADO, H.R.N. Daptomycin: Physico-chemical, analytical and pharmacological properties. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 37, p. 699-710, 2015.
- 2) TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Rapid turbidimetric assay to determine the potency of daptomycin in lyophilized powder. **Pharmaceutics**, v. 7, p. 106-121, 2015.
- 3) TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development, optimization, and validation of a green and stability-indicating HPLC method for determination of daptomycin in lyophilized powder. **Journal of AOAC International**, v. 98, p. 1276-1285, 2015.
- 4) TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. A green approach for the determination of daptomycin in pharmaceutical formulation by UV spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 811-822, 2015.

Durante o período da bolsa de doutorado, a aluna participou de diversos eventos internacionais, com apresentação de trabalhos e publicação de resumos. Estas atividades estão descritas a seguir:

- a) **Evento:** “10th International Symposium on Drug Analysis and 25th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis”.

Trabalho apresentado (Pôster):

- “Validation of an environmental friendly spectrophotometric method for the analysis of daptomycin in lyophilized powder”.

Local e data: Liege, Bélgica, entre os dias 23-25 de junho de 2014.

Resumo publicado:

- TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Validation of an environmental friendly spectrophotometric method for the analysis of daptomycin in lyophilized powder. In: 10th International Symposium on Drug Analysis and 25th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014,

Liege, Bélgica. **Drug Analysis 2014: Programme and Abstract Book**, 2014. p. 284-284.

- b) **Evento:** “3º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICIFA 2014)”.

Trabalhos apresentados (Pôsteres):

- “Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of daptomycin in powder for injectable solution”.
- “Forced degradation study of daptomycin in powder for injectable solution”.

Local e data: Córdoba, Argentina, entre os dias 18-19 de setembro de 2014.

- c) **Evento:** “XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines y VII Congreso Colombiano de Cromatografía (COLACRO 2014 y COCOCRO 2014)”.

Trabalhos apresentados (Pôsteres):

- “Development and validation of an environmentally friendly and stability-indicating HPLC method for the determination of daptomycin in powder for injectable solution”
- “Development of a fast and stability-indicating thin layer chromatography (TLC) method for the evaluation of daptomycin in lyophilized powder”

Local e data: Cartagena de Indias, Colômbia, entre os dias 29 de setembro a 03 de outubro de 2014.

Resumos publicados:

- TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of an environmentally friendly and stability-indicating HPLC method for the determination of daptomycin in powder for injectable solution. In: XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines, 2014, Cartagena das Índias. **Memorias COLACRO 2014 y COCOCRO 2014**. Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Químicas, 2014. p. P-QA-50. **Memorias COLACRO 2014 y COCOCRO 2014**. Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Químicas, 2014. p. P-IN-27.
- TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development of a fast and stability-indicating thin layer chromatography (TLC) method for the evaluation of daptomycin in lyophilized powder. In: XV Congreso Latinoamericano de

Cromatografía y Técnicas Afines, 2014, Cartagena das Índias. **Memorias COLACRO 2014 y COCOCRO 2014**. Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Químicas, 2014. p. P-IN-27.

- d) **Evento:** “18th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacology (ICPSP 2016)”.

Trabalho apresentado (Apresentação Oral):

- “Development and validation of a green analytical method for the analysis of daptomycin injectable by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)”.

Local e data: Paris, França, entre os dias 21-22 de janeiro de 2016.

Resumo publicado:

- TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. *Development and validation of a green analytical method for the analysis of daptomycin injectable by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)*. In: 18th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacology, 2016, Paris, França. **WASET (World Academy of Science, Engineering and Technology): International Science Index**, 2016. p. 2111-2111.

13. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, S.M.; BENZIGER, D.P.; JACOBS, R.F.; JAFRI, H.S.; HONG, EF.; KEARNS, G.L. Single-dose pharmacokinetics of daptomycin in children with suspected or proved gram-positive infections. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, n. 4, p. 330-334, 2008.

ALSANTE, K.M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T.D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 29-37, 2007.

ANASTAS, P.T.; WARNER, J.C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. New York: Oxford University Press, 1998, p.30.

ANASTAS, P.T. Green Chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 167-175, 1999.

ANASTASIOU, D.M.; MORGAN, M.; RUANE, P.J.; STEENBERGEN, J.N.; KATZ, B.D.; ALDER, J.D.; THORNE, G.M. *In vitro* activity of daptomycin against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *S. aureus* with known virulence factors, including community-acquired methicillin-resistant isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 61, p. 339–342, 2008.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JUNIOR, L.V. **Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 17. ed. Gaithesburg: AOAC, 2002. v. 1, p. xx.

BAIETTO, L.; D'AVOLIO, A.; ROSA, F.G.; GARAZZINO, S.; MICHELAZZO, M.; VENTIMIGLIA, G.; SICCARDI, M.; SIMIELE, M.; SCIANDRA, M.; PERRI, G. Development and validation of a simultaneous extraction procedure for HPLC-MS quantification of daptomycin, amikacin, gentamicin, and rifampicin in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 791-798, 2010.

BAIETTO, L.; D'AVOLIO, A.; PACE, S.; SIMIELE, M.; MARRA, C.; ARIAUDO, A.; PERRI, G.D.; ROSA, F.G.D. Development and validation of an UPLC–PDA method to

quantify daptomycin in human plasma and in dried plasma spots. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 66-70, 2014.

BAMBEKE, F.V.; MINGEOT-LECLERCQ, M.-P.; STRUELENS, M.J.; TULKENS, P.M. The bacterial envelope as a target for novel anti-MRSA antibiotics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 124-134, 2008.

BAZOTI, F.N.; GIKAS, E.; SKOUTELIS, A.; TSARBOPOULOS, A. Development and validation of an ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantification of daptomycin in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 78–85, 2011.

BELL, J.M.; TURNIDGE, J.D.; SADER, H.S.; JONES, R.N. Antimicrobial activity and spectrum of daptomycin: results from the surveillance program in Australia and New Zealand (2008). **Pathology**, v. 42, n. 5, p. 470-473, 2010.

BERTSCHE, U.; WEIDENMAIER, C.; KUEHNER, D.; YANG, S.-J.; BAUR, S.; WANNER, S.; FRANCOIS, P.; SCHRENZEL, J.; YEAMAN, M.R.; BAYER, A.S. Correlation of daptomycin resistance in a clinical *Staphylococcus aureus* strain with increased cell wall teichoic acid production and D-alanylation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3922-3928, 2011.

BERZAS, J.J.; GUIBERTEAU, C.; VILLASEÑOR, M.J.; RODRÍGUEZ, V. Development of a capillary gas chromatographic procedure for determining selective serotonin reuptake inhibitors: Validation study and experimental design to evaluate the robustness of method. **Analytica Chimica Acta**, v. 519, p. 219-230, 2004.

BLAIR, J.M.A.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L.J.V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, p. 42-51, 2015.

BLESSY, M.; PATEL, R.D.; PRAJAPATI, P.N.; AGRAWAL, Y.K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, p. 159-165, 2014.

BLIESNER, D.M. **Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide**. Hoboken - New Jersey: John Wiley & Sons, 2006. p. 1.

BORINELLI, B.; COLTRO, F.L.Z.; MORIYA, I.; SANTOS, L.M.L. Regulação ambiental e consumo sustentável: uma discussão a partir da percepção dos consumidores de Londrina-PR. **Revista Capital Científico**, v. 8, n. 1, p. 77-91, 2010.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei 6938 de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 setembro 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Aprova o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 junho 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1 de agosto 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 abril 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 maio 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com princípios ativos sintéticos e semi-sintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 janeiro 2012.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMAN, B.B. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. São Paulo: AMGH, 2012. 2079 p.

BUBALO, J.S.; MUNAR, M.Y.; CHERALA, G.; HAYES-LATTIN, B.; MAZIARZ, R. Daptomycin pharmacokinetics in adult oncology patients with neutropenic fever. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p.428-434, 2009.

BUTLER, M.S.; BLASKOVICH, M.A.; COOPER, M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, p. 571-591, 2013.

CAFISO, V.; BERTUCCIO, T.; PURRELLO, S.; CAMPANILE, F.; MAMMINA, C.; SARTOR, A.; RAGLIO, A.; STEFANI, S. *dltA* overexpression: a strain-independent keystone of daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, p. 26-31, 2014.

CHITNIS, S.; KATARA, G.; HEMVANI, N.; PAREEK, S.; CHITNIS, D.S. *In vitro* activity of daptomycin & linezolid against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* & vancomycin resistant enterococci isolated from hospitalized cases in Central India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 137, p. 191-196, 2013.

CHRIST, A.P.; MACHADO, M.S.; ROSA, P.; CODEVILLA, C.F.; ROLIM, C.M.B.; ADAMS, A.I.H. Development and validation of a stability-indication LC-UV method for determination of daptomycin injectable form and kinetic study in alkaline medium. **Analytical Methods**, v. 6, p. 1242-1247, 2014.

CLSI – **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. v. 31, n. 1. Wayne: CLSI, 2011. 184 p.

CLSI - **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard; 9. ed. CLSI document M07-A9. Wayne: CLSI; 2012. 68 p.

COLOMBARA, R.; TAVARES, M.F.M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Química Nova**, v. 20, p. 512-518, 1997.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Editora UNICAMP, 1997.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora UNICAMP, 2006. p. 40.

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.

- CORRÊA, J.C.R.; SALGADO, H.R.N. A platform for designing quantitative infrared spectrophotometric method for drugs and pharmaceuticals analysis: a rediscover for an ecological and safer technique in the routine quality control laboratories. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 2056-2059, 2014.
- COTTAGNOUD, P.; PFISTER, M.; ACOSTA, F.; COTTAGNOUD, M.; FLATZ, L.; KUHN, F.; MULLER, H.-P.; STUCKI, A. Daptomycin is highly efficacious against penicillin-resistant and penicillin- and quinolone-resistant pneumococci in experimental meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3928-3933, 2004.
- CREAMER, J.S.; OBORNY, N.J.; LUNTE, S.M. Recent advances in the analysis of therapeutic proteins by capillary and microchip electrophoresis. **Analytical Methods**, v. 6, p. 5427- 5449, 2014.
- CUBICIN. Comercialização mundial da daptomicina. Disponível em: <http://www.drugs.com/international/daptomycin.html>. Acesso em: 20 ago. 2016.
- DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova Escola**, p. 21-25, 1998.
- DHAWAN, B.; GADEPALLI, R.; KAPIL, A. *In vitro* activity of daptomycin against *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates associated with skin and soft tissue infections: first results from India. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, p. 196–198, 2009.
- DIEDEREN, B.M.W.; VAN DUIN, I.; WILLEMSE, P.; KLUYTMANS, J.A.J.W. In Vitro Activity of daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, including heterogeneously glycopeptide-resistant strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3189–3191, 2006.
- DVORCHIK, B.; DAMPHOUSSE, D. Single-dose pharmacokinetics of daptomycin in young and geriatric volunteers. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 44, p. 612-620, 2004.
- EDEN, G.; BURKHARDT, O.; CLAJUS, C.; KIELSTEIN, J.T. Daptomycin for a complicated urinary tract infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a renal transplant recipient. **Clinical Kidney Journal**, v. 5, p. 350–351, 2012.

EISENSTEIN, B.I.; OLESON Jr., F.B.; BALTZ, R.H. Daptomycin: from the mountain to the clinic, with essential help from Francis Tally, MD. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. S10-S15, 2010.

ELIOPOULOS, G.M.; WILLEY, S.; REISZNER, E.; SPITZER, P.G. *In vitro* and *in vivo* activity of LY 146032, a new cyclic lipopeptide antibiotic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n. 4, p. 532-535, 1986.

EL-SHEMI, A.G.; FAIDAH, H.S. Synergy of daptomycin with fusidin against invasive systemic infection and septic arthritis induced by type VI group B streptococci in mice. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 8, p. 1125-1131, 2011.

ENTENZA, J.M.; GIDDEY, M.; VOUILLAMOZ, J.; MOREILLON, P. *In vitro* prevention of the emergence of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus* and enterococci following combination with amoxicillin/clavulanic acid or ampicillin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 451-456, 2010.

ESMERINO, L.A.; PEREIRA, A.V.; ADAMOWICZ, T.; BORGES, D.M.; TALACIMON, E.A.; SCHELESKY, M.E. Método microbiológico para determinação da potência de antimicrobianos. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 10, p. 53-60, 2004.

ESTES, K.S.; DERENDORF, H. Comparison of the pharmacokinetic properties of vancomycin, linezolid, tigecyclin, and daptomycin. **European Journal of Medical Research**, v. 15, p. 533-543, 2010.

EUCAST - **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, valid from 2014-01-01. Sweden: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2014. 79 p.

FAROUK, F.; MOUSSA, B.A.; AZZAZY, H.M.E-S. Fourier transform infrared spectroscopy for in-process inspection, counterfeit detection and quality control of anti-diabetic drugs. **Spectroscopy**, v. 26, p. 297-309, 2011.

FB. FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. I, p. 261-269; v. II, p. 75-87.

FDA - Food and Drug Administration. **Validation of Chromatographic Methods**. Washington: Center for Drug and Evaluation and Research, 1994.

FDA - Food and Drug Administration. Guidance for Industry: **Analytical Procedures and Methods Validation**. Rockville: Center for Drug Evaluation and Research and Center for Biologics Evaluation and Research, 2000.

FIORENTINO, F.A.M.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a UV-spectrophotometric method for determination of flucloxacillin sodium in capsules. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 8, p. 101-106, 2012.

FOWLER, V.G.; BOUCHER, H.W.M.H.S.; COREY, G.R.; ABRUTYN, E.; KARCHMER, A.W.; RUPP, M.E.; LEVINE, D.P.; CHAMBERS, H.F.; TALLY, F.P.; VIGLIANI, G.A.; CABELL, M.D.; LINK, A.S.M.H.S.; DEMEYER, I.; FILLER, S.G.; ZERVOS, M.; COOK, P.; PARSONNET, J.; BERNSTEIN, J.M.; PRICE, C.V.; FORREST, G.N.; FATKENHEUER, G.; GARECA, M.; REHM, S.J.; BRODT, H.R.; TICE, A. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 7, p. 653-665, 2006.

FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.-J.; VERHOEF, J.; MILATOVIC, D. Daptomycin in vitro susceptibility in European Gram-positive clinical isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 59-66, 2004.

FRIEDMAN, L.; ALDER, J.D.; SILVERMAN, J.A. Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2137-2145, 2006.

FUCHS, P.C.; BARRY, A.L.; BROWN, S.D. Daptomycin susceptibility tests: interpretive criteria, quality control, and effect of calcium on in vitro tests. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, p. 51-58, 2000.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIÉŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013.

GARCÍA-SÁNCHEZ, J.E.; GARCÍA-MERINO, E.; MARTÍN-DEL-REY, Á.; GARCÍA-SÁNCHEZ, E. Antibioterapia para el siglo XXI, antibacterianos para la segunda década. ¿Posibilidades o realidades en un futuro? **Revista Española de Quimioterapia**, v. 25, n. 2, p. 100-121, 2012.

GARRIGUES, S.; GALLIGNANI, M.; DE LA GUARDIA, M. FIA-FT-IR determination of ibuprofen in pharmaceuticals. **Talanta**, v. 40, p. 89-93, 1993.

GASCH, O.; CAMOEZ, M.; DOMÍNGUEZ, M.A.; PADILLA, B.; PINTADO, V.; ALMIRANTE, B.; MARTÍN, C.; LÓPEZ-MEDRANO, F.; RUIZ DE GOPEGUI, E.; BLANCO, J.R.; GARCÍA-PARDO, G.; CALBO, E.; MONTERO, M.; GRANADOS, A.; JOVER, A.; DUEÑAS, C.; PUJOL, M. Emergence of resistance to daptomycin in a cohort of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* persistent bacteraemia treated with daptomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, doi:10.1093/jac/dkt396, 2014.

GIKA, H.G.; MICHPOULOS, F.; DIVANIS, D.; METALIDIS, S.; NIKOLAIDIS, P.; THEODORIDIS, G.A. Daptomycin determination by liquid chromatography–mass spectrometry in peritoneal fluid, blood plasma, and urine of clinical patients receiving peritoneal dialysis treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 2191–2197, 2010.

GIKAS, E.; BAZOTI, F.N.; FANOUGIAKIS, P.; PERIVOLIOTI, E.; ROUSSIDIS, A.; SKOUTELIS, A.; TSARBOPOULOS, A. Development and validation of a UPLC-UV method for the determination of daptomycin in rabbit plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 24, p. 522-527, 2010a.

GIKAS, E.; BAZOTI, F.N.; FANOUGIAKIS, P.; PERIVOLIOTI, E.; ROUSSIDIS, A.; SKOUTELIS, A.; TSARBOPOULOS, A. Simultaneous quantification of daptomycin and rifampicin in plasma by ultra performance liquid chromatography: Application to a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 901-906, 2010b.

GONG, W.; WANG, J.; CHAI, J.; FENG, J. Determination of daptomycin for injection by HPLC. **Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi**, v. 45, p. 971-972, 2014.

GOULD, I.M.; MIRÓ, J.M.; RYBAK, M.J. Daptomycin: The role of high-dose and combination therapy for Gram-positive infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, p. 202-210, 2013.

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

- GREEN, M.R.; ANASETTI, C.; SANDIN, R.; ROLFE, N.E. Development of daptomycin resistance in a bone marrow transplant patient with vancomycin-resistant *Enterococcus durans*. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 12, p. 179-181, 2006.
- GRÉGOIRE, C.; BRUMPT, C.; LOIRAT, D.; LAU, N.; BRUEL, C.; PHILIPPART, F.; COUZIGOU, C.; GARROUSTE-ORGEAS, M.; MISSET, B. A case of daptomycin-induced immune thrombocytopenia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6430-6431, 2012.
- GUARDIA, M.D.; ARMENTA, S. Green analytical methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 625-626, 2012.
- GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- GUPTA, V.; SINGLA, N.; BEHL, P.; SAHOO, T.; CHANDER, J. Antimicrobial susceptibility pattern of vancomycin resistant enterococci to newer antimicrobial agents. **Indian Journal of Medical Research**, v. 141, p. 483-486, 2015.
- HANCOCK, R.E.W. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, p. 209-218, 2005.
- HAYDEN, M.K.; REZAI, K.; HAYES, R.A.; LOLANS, K.; QUINN, J.P.; WEINSTEIN, R.A. Development of daptomycin resistance *in vivo* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5285-5287, 2005.
- HEWITT, W. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach**. Boca Raton: Interpharm/CRC, 2004. p. 18-21.
- HIDRON, A.I.; SCHUETZ, A.N.; NOLTE, F.S.; GOULD, C.V.; OSBORN, M.K. Daptomycin resistance in *Enterococcus faecalis* prosthetic valve endocarditis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, doi:10.1093/jac/dkn105, 2008.
- HINDLER, J.F. **Antimicrobial Susceptibility Testing**. In: GARCIA, L.S. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3. ed. Washington: ASM Press, 2010. v. 3, p. 5.10.1-5.12.1.

ICH - **International Conference on Harmonization**. Good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients: Q7. Commission of the European Communities. Geneva, 2000.

ICH - **International Conference on Harmonization**. Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2). Geneva, 2003.

ICH - **International Conference on Harmonization**. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Geneva, 2005.

INMETRO - **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial**. Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, 2011.

JEFFERY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. **Vogel**: Análise química quantitativa. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 1992.

JØRGEN, B.; MERCKOLL, P.; MELBY, K.K. Susceptibility to daptomycin, quinupristin-dalfopristin and linezolid and some other antibiotics in clinical isolates of methicillin resistant and methicillin sensitive *S. aureus* from the Oslo area. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 39, p. 1059-1062, 2007.

JP. JAPANESE Pharmacopoeia. 16th ed. Tokyo Society of Japanese Pharmacopoeia, 2011. p. 385-387.

JUNG, D.; ROZEK, A.; OKON, M.; HANCOCK, R.E.W. Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin. **Chemistry & Biology**, v. 11, p. 949-957, 2004.

KATO, A.; NAKAYA, S.; OHASHI, Y.; HIRATA, H. WAP-8294A2, a novel anti-MRSA antibiotic produced by *Lysobacter* sp. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, p. 6680-6681, 1997.

KATO, A.; HIRATA, H.; OHASHI, Y.; FUJII, K.; MORI, K.; HARADA, K.-I. A new anti-MRSA antibiotic complex, WAP-8294A II. Structure characterization of minor components by ESI LCMS and MS/MS. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 373-379, 2011.

KAYA, S.; YILMAZ, G.; KALKAN, A.; ERTUNC, B.; KÖKSAL, I. Treatment of Gram-positive left-sided infective endocarditis with daptomycin. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, p. 698-702, 2013.

KELESIDIS, T. Transport of daptomycin resistance genes between animals and humans as a possible mechanism for development of *de novo* daptomycin resistance in enterococci. **Epidemiology & Infection**, v. 141, p. 2185–2186, 2013.

KELLEY, P.G.; GAO, W.; WARD, P.B.; HOWDEN, B.P. Daptomycin non-susceptibility in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous-VISA (hVISA): implications for therapy after vancomycin treatment failure. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1057–1060, 2011.

KING, E.A.; MCCOY, D.; DESAI, S.; NYIRENDA, T.; BICKING, K. Vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia and daptomycin: are higher doses necessary? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 2112–2118, 2011.

KIRSCH, L.E.; MOLLOY, R.M.; DEBONO, M.; BAKER, P.; FARID, K.Z. Kinetics of the aspartyl transpeptidation of daptomycin, a novel lipopeptide antibiotic. **Pharmaceutical Research**, v. 6, p. 387-393, 1989.

KOETH, L.M.; LECLERCQ, R.; OLSSON-LILJEQUIST, B. Comparison of daptomycin MIC results by DIN, NCCLS, SFM, and SRGA methods for 297 Gram-positive organisms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 17-24, 2004.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of infrared spectroscopy method for the determination of darunavir in tablets. **Physical Chemistry**, v. 33, p. 1-6, 2013.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Comparative study over methods developed for quantification of darunavir in tablets by environmental friendly infrared and capillary electrophoretic techniques. **Journal International Research in Medical and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 99-105, 2015.

KULLAR, R.; CHIN, J.N.; EDWARDS, D.J.; PARKER, D.; COPLIN, W.M.; RYBAK, M.J. Pharmacokinetics of single-dose daptomycin in patients with suspected or confirmed neurological infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3505-3509, 2011.

KUMAR, S.N.; SIJI, J.V.; NAMBISAN, B. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria *in vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 3143-3150, 2012.

LA ROCA, M.F.; SOARES Sobrinho, J.L.; NUNES, L.C.C.; ROLIM Neto, P.J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, p. 177-180, 2007.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. Testes de estabilidade e fundamentos da cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.; KANIG, J. (Ed). **Teoria e prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. Cap.26, v.2, p.1277-1255.

LEE, Y.-S.; JANG, K.-A.; CHA, J.-D. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

LEONARD, S.N.; ROLEK, K.M. Evaluation of the combination of daptomycin and nafcillin against vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 644-647, 2013.

LOPES, H.V. Daptomicina: finalmente disponível para a América do Sul. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 10, n. 3, p. 70-71, 2008.

LUCHTING, B.; WEIS, F.; HEYN, J.; BEIRAS-FERNANDEZ, A. Daptomycin for the treatment of gram-positive infections after cardiac surgery. **Medizinische Klinik Intensivmed Notfmed**, v. 108, p. 59-62, 2013.

MALLAH, M.A.; SHERAZI, S.T.H.; BHANGER, M.I.; MAHESAR, S.A.; BAJEER, M.A. A rapid Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopic method for direct quantification of paracetamol content in solid pharmaceutical formulations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 141, p. 64-70, 2015.

MALLI, E.; SPILIOPOULOU, I.; KOLONITSIOU, F.; KLAPSA, D.; GIANNITSIOTI, E.; PANTELIDI, K.; PRATTI, A.; PANOPOULOU, M.; GRAPSA, S.; ALEPOPOULOU, E.; NEONAKIS, I.; FRANTZIDOU, F.; ALEXIOU-DANIEL, S.; BAKOLA, D.; KOUTSIA-CAROUZOU, C.; MALAMOU-LADA, H.; ZERVA, L.; VLAHAKI, E.; KARTALIKTENIDOU, S.; ANASTASSIOU, E.D.; PETINAKI, E. *In vitro* activity of daptomycin against Gram-positive cocci: the first multicentre study in Greece. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 525-528, 2008.

MARTENS-LOBENHOFFER, J.; KIELSTEIN, J.T.; OYE, C.; BODE-BÖGER, S.M. Validated high performance liquid chromatography–UV detection method for the determination of daptomycin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 875, p. 546-550, 2008.

MASCIO, C.T.M.; MORTIN, L.I.; HOWLAND, K.T.; PRAAGH, A.D.G.V.; ZHANG, S.; ARYA, A.; CHUONG, C.L.; KANG, C.; LI, T.; SILVERMAN, J.A. *In vitro* and *in vivo* characterization of CB-183,315, a novel lipopeptide antibiotic for treatment of *Clostridium difficile*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 10, p. 5023-5030, 2012.

MATKOVIC, S.R.; VALE, G.M.; GALLE, M.; BRIAND, L.E. Desarrollo y validación del análisis cuantitativo de ibuprofeno en comprimidos por espectroscopía infrarroja. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, p. 527-532, 2004.

MENDES, R.E.; JONES, R.N.; DESHPANDE, L.; ROSS, J.E.; SADER, H.S. Daptomycin activity tested against linezolid-nonsusceptible gram-positive clinical isolates. **Microbial Drug Resistance**, v. 15, n. 4, p. 245-249, 2009.

MENDES, C.D.S.; ANTUNES, A.M.S. Pipeline of known chemical classes of antibiotics. **Antibiotics**, v. 2, p. 500-534, 2013.

MERCK. **Cubicin Prescribing Information**. Disponível em: http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/c/cubicin/cubicin_pi.pdf. Acesso em: 01 jul. 2016a.

MERCK. **Products & Pipeline**. Disponível em: <http://www.merck.com/research/pipeline/home.html>. Acesso em: 01 jul. 2016b.

MILLER, B.A.; GRAY, A.; LEBLANC, T.W.; SEXTON, D.J.; MARTIN, A.R.; SLAMA, T.G. Acute eosinophilic pneumonia secondary to daptomycin: a report of three cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 11, p. e63-e68, 2010.

MIRANDA, C.E.S.; CARRILHO, E. Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA-CE): desafios, aplicações e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 412-419, 2002.

MISHRA, N.N.; BAYER, A.S.; MOISE, P.A.; YEAMAN, M.R.; SAKOULAS, G. Reduced susceptibility to host-defense cationic peptides and daptomycin coemerge in methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* from daptomycin-naïve bacteremic patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, p. 1160-1167, 2012.

MITCHELL, G.; LAFRANCE, M.; BOULANGER, S.; SÉGUIN, D.L.; GUAY, I.; GATTUSO, M.; MARSAULT, E.; BOUARAB, K.; MALOUIN, F. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 559- 568, 2012.

MIYABE, K.; TAKEUCHI, S.; TEZUKA, Y. Adsorption characteristics in reversed-phase liquid chromatography using ethanol/water mixed solvent. **Adsorption**, v. 5, p. 15-24, 1999.

MOHR, J.F.; FRIEDRICH, L.V.; YANKELEV, S.; LAMP, K.C. Daptomycin for the treatment of enterococcal bacteraemia: results from the Cubicin® Outcomes Registry and Experience (CORE). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 543–548, 2009.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Microbiological assay for ceftazidime injection. **Journal of AOAC International**, v. 90, p. 1379-1382, 2007.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Rapid and selective UV spectrophotometric method for the analysis of ceftazidime. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 3, p. 820-823, 2009.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ceftazidime in powder for injection by infrared spectroscopy. **Physical Chemistry**, v. 2, p. 6-11, 2012.

MORETTO, L.D.; MASTELARO, R. **Manual das Denominações Comuns Brasileiras**. 16. ed. São Paulo: Manuais SINDUSFARMA, 2013, 704 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/2013/Manual%20DCB%202013%20Vers%C3%A3o%20final.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2016.

MUANGSIRI, W.; KIRSCH, L.E. The kinetics of the alkaline degradation of daptomycin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, p. 1066-1075, 2001.

- MUANGSIRI, W.; KEARNEY, W.R.; TEESCH, L.M.; KIRSCH, L.E. Studies on the reactions between daptomycin and glyceraldehyde. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 133-150, 2005.
- MUNOZ-PRICE, L.S.; LOLANS, K.; QUINN, J.P. Emergence of resistance to daptomycin during treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 565–566, 2005.
- MURILLO, O.; GARRIGÓS, C.; PACHÓN, M.E.; EUBA, G.; VERDAGUER, R.; CABELLOS, C.; CABO, J.; GUDIOL, F.; ARIZA, J. Efficacy of high doses of daptomycin versus alternative therapies against experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4252–4257, 2009.
- NAITO, T.; YAMADA, T.; YAGI, T.; KAWAKAMI, J. Simple and validated UHPLC method coupled to UV detection for determination of daptomycin in human plasma and urine. **Biomedical Chromatography**, v. 28, p. 317-319, 2014.
- NATORI, J.S.H.; TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. (No prelo) Development and validation of a green analytical method for determination of norfloxacin in raw material by Fourier-Transform Infrared Spectrophotometry (FT-IR). **Journal of AOAC International**, 2016.
- NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline M26-A. Wayne, Pennsylvania, USA, 1999.
- NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de Físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- NOLASCO, F.R.; TAVARES, G.A.; BENDASSOLLI, J.A. Implantação de programas de gerenciamento de resíduos químicos laboratoriais em universidades: análise crítica e recomendações. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, p. 118-124, 2006.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

- OLESON, F.B.; BERMAN, C.L.; LI, A.P. An evaluation of the P450 inhibition and induction potential of daptomycin in primary human hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, p. 137–147, 2004.
- OLSZOWY, P.; SZULTKA, M.; FUCHS, P.; KEGLER, R.; MUNDKOWSKI, R.; MIEKISCH, W.; SCHUBERT, J.; BUSZEWSKI, B. New coated SPME fibers for extraction and fast HPLC determination of selected drugs in human blood. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 1022–1027, 2010.
- PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2720-2722, 2002.
- PARISOTTO, G.; SOUZA, J.S.; FERRÃO, M.F.; FURTADO, J.C.; MOLZ, R.F. Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 499-505, 2005.
- PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validation of chromatographic methods for the determination of residues of veterinary drugs in foods. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716 p.
- PEDROSO, T.M.; SALGADO, H.R.N. Validation of cefazolin sodium by UV-spectrophotometric method. **Physical Chemistry**, v. 3, p. 11-20, 2013.
- PETERSEN, J.; MOHAMMAD, A.A. **Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis**. Nova York: Springer Science+Business Media, 2001. 454p.
- PIANTAVINI, M.S.; PONTAROLO, R.; PONTES, F.L.D.; UBER, C.P.; STREMEL, D.P.; SENA, M.M. Chemometric quality inspection control of pyrantel pamoate, febantel and praziquantel in veterinary tablets by mid infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 125, p. 396-403, 2014.
- PICAZO, J.J.; BETRIU, C.; CULEBRAS, E.; RODRÍGUEZ-AVIAL, I.; GÓMEZ, M.; LÓPEZ-FABAL, F. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: sensibilidad a la

daptomicina a lo largo de un periodo de 10 años (2001-2010). **Revista Española de Quimioterapia**, v. 24, n. 2, p. 107-111, 2011.

PIDDOCK, L.J.V. The crisis of no new antibiotics - what is the way forward? **The Lancet**, v. 12, p. 249-253, 2011.

PILLAI, S.K.; MOELLERING, R.C; ELIOPOULOS, G.M. Antimicrobial combinations. In: LORIAN, V. (Ed.). **Antibiotics in laboratory medicine**. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 365-400.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 3-4; 16-23.

PIRRI, G.; GIULIANI, A.; NICOLETTO, S.F.; PIZZUTO, L.; RINALDI, A.C. Lipopeptides as anti-infectives: a practical perspective. **Central European Journal of Biology**, v. 4, n. 3, p. 258-273, 2009.

POEPPL, W.; TOBUDIC, S.; LINGSCHIED, T.; PLASENZOTTI R.; KOZAKOWSKI, N.; LAGLER H.; GEORGOPOULOS, A.; BURGMANN, H. Daptomycin, fosfomycin, or both for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in an experimental rat model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4999–5003, 2011.

POLILLO, M.; TASCINI, C.; LASTELLA, M.; MALACARNE, P.; CIOFI, L.; VIAGGI, B.; BOCCI, G.; MENICHETTI, F.; DANESI, R.; DEL TACCA, M.; DI PAOLO, A. A rapid high-performance liquid chromatography method to measure linezolid and daptomycin concentrations in human plasma. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 32, n. 2, p. 200-205, 2010.

PRISTA, L.V.N.; ALVES, A.C.N.; CAMPOS, R.M. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990.

RAND, K.H.; HOUCK, H.J. Synergy of daptomycin with oxacillin and other β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 2871-2875, 2004a.

- RAND, K.H.; HOUCK, H.J. Daptomycin synergy with rifampicin and ampicillin against vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 530-532, 2004b.
- 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.
- RIBEIRO, R.L.V.; GRESPAN, C.B.; COLLINS, C.H.; COLLINS, K.E.; BRUNS, R.E. Optimization through factorial planning of the use of ethanol:water as a mobile phase for reversed phase HPLC. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, p. 52-54, 1999.
- RIBEIRO, R.L.V.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, K.E.; COLLINS, C.H. Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLC-RP mobile phases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 300-306, 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.
- ROZATTO, M.R. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*. Araraquara, 2012. 100 p. [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Araraquara SP].
- SABOL, K.; PATTERSON, J.E.; LEWIS II, J.S.; OWENS, A.; CADENA, J.; JORGENSEN, J.H. Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1664-1664, 2005.
- SADER, H.S.; STREIT, J.M.; FRITSCHKE, T.R.; JONES, R.N. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated from European medical centres: results of the Daptomycin Surveillance Programme (2002–2004). **Clinical Microbiology Infection**, v. 12, p. 844-852, 2006.
- SADER, H.S.; WATTERS, A.A.; FRITSCHKE, T.R.; JONES, R.N. Daptomycin antimicrobial activity tested against methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci isolated in European medical centers (2005). **BMC Infectious Diseases**, v. 7, p. 7-29, 2007.

SADER, H.S.; MOET, G.J.; JONES, R.N. Antimicrobial resistance among gram-positive bacteria isolated in Latin American Hospitals. **Journal of Chemotherapy**, v. 21, n. 6, p. 611-620, 2009a.

SADER, H.S.; MOET, G.; JONES, R.N. Update on the *in vitro* activity of daptomycin tested against 17,193 gram-positive bacteria isolated from European Medical Centers (2005-2007). **Journal of Chemotherapy**, v. 21, n. 5, p. 500-506, 2009b.

SADER, H.S.; JONES, R.N. Antimicrobial activity of daptomycin in comparison to glycopeptides and other antimicrobials when tested against numerous species of coagulase-negative *Staphylococcus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 212-214, 2012.

SADER, H.S.; FARRELL, D.J.; FLAMM, R.K.; JONES, R.N. Daptomycin activity tested against 164.457 bacterial isolates from hospitalised patients: Summary of 8 years of a Worldwide Surveillance Programme (2005-2012). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, p. 465-469, 2014.

SAKOULAS, G.; ALDER, J.; THAUVIN-ELIOPOULOS, C.; MOELLERING JR., R.C. Induction of daptomycin heterogeneous susceptibility in *Staphylococcus aureus* by exposure to vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1581-1585, 2006.

SANSEVERINO, A.M. Síntese orgânica limpa. **Química Nova**, v. 23, p. 102-107, 2000.

SANTOS, M.R.; TAVARES, M.F.M., RUBIM, J.C. Implementação de um sistema de eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser. **Química Nova**, v. 23, p. 585-589, 2000.

SCHNEIDER, T.; MÜLLER, A.; MIESS, H.; GROSS, H. Cyclic lipopeptides as antibacterial agents – Potent antibiotic activity mediated by intriguing mode of actions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 37-43, 2014.

SEATON, R.A.; MALIZOS, K.N.; VIALE, P.; GARGALIANOS-KAKOLYRIS, P.; SANTANTONIO, T.; PETRELLI, E.; PATHAN, R.; HEEP, M.; CHAVES, R.L. Daptomycin use in patients with osteomyelitis: a preliminary report from the EU-CORESM database. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 7, p. 1642-1649, 2013.

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, p. 57–66, 2003.

SHARMA, M.; RIEDERER, K.; CHASE, P.; KHATIB, R. High rate of decreasing daptomycin susceptibility during the treatment of persistent *Staphylococcus aureus* bacteremia. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 433-437, 2008.

SHEA, K.; HILBURGER, E.; BAROCO, A.; OLDFIELD, E. Successful treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* pyelonephritis with daptomycin during pregnancy. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 42, p. 722–725, 2008.

SHERAZI, S.T.H.; ALI, M.; MAHESAR, S.A. Application of Fourier-transform infrared (FT-IR) transmission spectroscopy for the estimation of roxithromycin in pharmaceutical formulations. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, p. 115-118, 2011.

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, p. 10-15, 2012.

SILVA, L.M. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade de tigeciclina em produto farmacêutico**. Araraquara, 2012. 179 p. [Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Araraquara SP].

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M.; TERENCEZI, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SILVERMAN, J.A.; MORTIN, L.I.; VANPRAAGH, A.D.G.; LI, T.; ALDER, J. Inhibition of daptomycin by pulmonary surfactant: in vitro modeling and clinical impact. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p. 2149-2152, 2005.

SILVERMAN, J.A.; PERLMUTTER, N.G.; SHAPIRO, H.M. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 8, 2538-2544, 2003.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2007. p. 70-122.

SKIEST, D.J. Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 655-656, 2006.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3. ed. New Jersey: Willey, 2010. 912 p.

SPUDEIT, D.A.; DOLZAN, M.D.; MICKE, G.A. Conceitos básicos em eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 287-297, 2012.

STEENBERGEN, J.N.; ALDER, J.; THORNE, G.M.; TALLY, F.P. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 283-288, 2005.

STREIT, J.M.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Daptomycin activity and spectrum: a worldwide sample of 6737 clinical Gram-positive organisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 669-674, 2004.

STREIT, J.M.; STEENBERGEN, J.N.; THORNE, G.M.; ALDER, J.; JONES, R.N. Daptomycin tested against 915 bloodstream isolates of viridans group streptococci (eight species) and *Streptococcus bovis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 574-578, 2005.

SUNTORNUSUK, L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 29-52, 2010.

SWEETMAN, S.C. (Ed). **Martindale: The Complete Drug Reference**. 37. ed. London: RPS Publishing, 2011. 4142 p.

SZULTKA, M.; KRZEMINSKI, R.; JACKOWSKI, M.; BUSZEWSKI, B. Simultaneous determination of selected chemotherapeutics in human whole blood by molecularly imprinted

polymers coated solid phase microextraction fibers and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 940, p. 66–76, 2013.

TAVARES, M.F.M.; MCGUFFIN, V.L. Theoretical model of electrosomotic flow for capillary zone electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 3687-3696, 1995.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, p. 493-511, 1997.

TEMPLETON, A.; PADEIRO, D. **United States Pharmacopoeia - Global Education and Training: Impurezas e estudos de degradação forçada**. Material didático distribuído em curso ministrado entre os dias 17 e 18 de março de 2014, na cidade de São Paulo-SP.

TOBIN, C.M.; DARVILLE, J.M.; LOVERING, A.M.; MACGOWAN, A.P. An HPLC assay for daptomycin in serum. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 1462–1476, 2008.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ampicillin sodium in powder for injection by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). **Physical Chemistry**, v. 2, p. 103-108, 2012.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of a rapid turbidimetric assay to determine the potency of ampicillin sodium in powder for injectable solution. **Analytical Methods**, v. 5, p. 5923-5928, 2013.

TÓTOLI, E.G.; GARG, S.; SALGADO, H.R.N. Daptomycin: physico-chemical, analytical and pharmacological Properties. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 37, p. 699-710, 2015.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Rapid turbidimetric assay to determine the potency of daptomycin in lyophilized powder. **Pharmaceutics**, v. 7, p. 106-121, 2015.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Development, optimization, and validation of a green and stability-indicating HPLC method for determination of daptomycin in lyophilized powder. **Journal of AOAC International**, v. 98, p. 1276-1285, 2015.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. A green approach for the determination of daptomycin in pharmaceutical formulation by UV spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 811-822, 2015.

TRACZEWSKI, M.M.; KATZ, B.D.; STEENBERGEN, J.N.; BROWN, S.D. Inhibitory and bactericidal activities of daptomycin, vancomycin, and teicoplanin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected from 1985 to 2007. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 1735–1738, 2009.

USP 37. The United States Pharmacopeia. The National Formulary (NF 32). 37. ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, 2014. v. 1, p. 306-308, 1157-1163.

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.

VERDIER, M.-C.; BENTUÉ-FERRER, D.; TRIBUT, O.; COLLET, N.; REVEST, M.; BELLISSANT, E. Determination of daptomycin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, n. 1, p. 69-75, 2011.

VIEIRA, D.C.M.; SALGADO, H.R.N. Development of quantitative methodology for determination of cefuroxime sodium. **Advances in Analytical Chemistry**, v. 2, p. 67-73, 2012.

WELCH, C.J.; WU, N.; BIBA, M.; HARTMAN, R.; BRKOVIC, T.; GONG, X.; HELMY, R.; SCHAFER, W.; CUFF, J.; PIRZADA, Z.; ZHOU, L. Greening analytical chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 667-680, 2010.

WHO - World Health Organization. International Program on Chemical Safety (IPCS). **Environmental Health Criteria 154 – acetonitrile**. Geneva, 1993.

WHO - World Health Organization. International Program on Chemical Safety (IPCS). **Environmental Health Criteria 196 – acetonitrile**. Geneva, 1997.

WHO - World Health Organization. **Quality Assurance of Pharmaceuticals: A compendium of guidelines and related materials**. v. 2, Good Manufacturing Practices and Inspection. 2. ed. Geneva, 2007.

WHO - World Health Organization. **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance**. Geneva: WHO, 2014.

WRIGHT, G.D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical Communications**, v. 47, p. 4055-4061, 2011.

ZHANG, J.; WALL, S.K.; XU, L.; EBNER, P.D. Contamination rates and antimicrobial resistance in bacteria isolated from “grass-fed” labeled beef products. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 11, p. 1331-1336, 2010.

ZHOU, J.; XIE, Y.; HUANG, J.; ZHENG, W.; FANG, D. RRLC determination of daptomycin in fermentation broth. **Fujian Fenxi Ceshi**, v. 21, p. 46-49, 2012.