

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS PARA O DOSEAMENTO DE  
DAPTOMICINA INJETÁVEL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Ana Paula Christ**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**



# **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O DOSEAMENTO DE DAPTOMICINA INJETÁVEL**

**Ana Paula Christ**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Andréa Inês Horn Adams**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Christ , Ana Paula  
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o doseamento de daptomicina injetável / Ana Paula Christ .-2013.  
136 p.; 30cm

Orientadora: Andréa Inês Horn Adams  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2013

1. Daptomicina 2. Antimicrobiano 3. Cromatografia líquida 4. Turbidimetria I. Adams , Andréa Inês Horn II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
PARA O DOSEAMENTO DE DAPTOMICINA INJETÁVEL**

elaborada por  
**Ana Paula Christ**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Andréa Inês Horn Adams, Dr<sup>a</sup>.**  
(Presidente/Orientadora)

**Ana Maria Bergold, Dr<sup>a</sup>. (UFRGS)**

**Clarice Madalena Bueno Rolim, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 30 de agosto de 2013.



Dedicado à minha família





## AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente.

À Profa. Dra. Andréa I. H. Adams pela oportunidade e constante disponibilidade, pelas palavras de apoio, pela confiança e pelo carinho nos momentos difíceis. Agradeço pelo exemplo, conhecimento e aprendizado, importantes para minha vida profissional.

Aos meus pais, Ivana e Darci, pelo amor incondicional, carinho, incentivo e compreensão durante este período e sempre. Aos meus irmãos, Daiana e Anderson pela companhia, amor e risos constantes. Agradeço a todos eles por compreender minhas ausências, me apoiar nos momentos mais difíceis e sempre incentivar meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Vítor pelo incentivo, por me levantar nos momentos mais difíceis e pelas palavras certas em todos os momentos. Obrigada pelo amor, pela disposição em me ouvir, por apoiar minhas decisões, me acalmar e me fazer sempre acreditar. Obrigada pelo carinho, pelos risos e sonhos compartilhados.

Ao Laboratório de Avaliação Biofarmacêutica e Controle de Qualidade (LABCQ) que me acolheu, disponibilizando equipamentos e materiais.

As minhas queridas “IC’s” Mariana Souto Machado e Karla Ribas, pela companhia, bom humor, auxílio incansável nos experimentos, dedicação, amizade e carinho de sempre.

À Priscila Rosa, minha colega de laboratório, disciplinas e constantes desabafos. Agradeço aos ensinamentos, paciência, boas risadas, ótimas conversas e amizade construída.

A todas as colegas de LABCQ Muriele Picoli, Ana Paula Salla, Tássia Lehmen, Tássia Dalcin, Juliana Santos, Laís Scheeren, Marjana Mohr e Ana Isa Marcolino pela companhia, pelo carinho que sempre tiveram comigo, pelas risadas e boas conversas que sempre tivemos.

Agradeço às meninas do Laboratório de Farmacotécnica pela convivência, ótimas conversas, boa companhia de sempre e pelo conhecimento compartilhado. Agradeço em especial a Professora Cristiane de Bona, pelo empréstimo de equipamentos essenciais para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA) de Santa Maria/RS, pelas análises em espectrofotometria no IV e pelo Laboratório de Controle de Qualidade da Farmácia Escola da UFSM pelas análises de ponto de fusão.

Ao Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) pelo fornecimento das amostras utilizadas no estudo. Ao Laboratório Farmoquímico Cristália, que através do farmacêutico Roberto Debom Moreira, concedeu a matéria prima de daptomicina, que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Prof. Marcos Martins e a pesquisadora Clarissa Frizzo pelas análises de DSC e TGA. Ao CNPq e Fapergs pelo apoio financeiro durante a realização deste estudo.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e não foram diretamente citados.



“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

(Isaac Newton)



## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA O DOSEAMENTO DE DAPTOMICINA INJETÁVEL**

AUTORA: ANA PAULA CHRIST

ORIENTADORA: DR<sup>a</sup> ANDRÉA INÊS HORN ADAMS

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 30 de agosto de 2013

Este trabalho apresenta o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o doseamento da daptomicina injetável. A daptomicina é um antibiótico pertencente a uma nova classe de antimicrobianos, conhecidos como lipopeptídeos cíclicos. Foi aprovada para comercialização nos Estados Unidos em 2003 e no Brasil em 2009. Até o momento, não foram relatados métodos de quantificação para o fármaco em produtos farmacêuticos, tanto na literatura científica quanto em compêndios oficiais. Foram realizados métodos para a caracterização da matéria-prima como solubilidade, ponto de fusão, espectrofotometria no infravermelho (IV) e na região do ultravioleta (UV) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), sendo que os mesmos permitiram a identificação do fármaco na matéria-prima. Os seguintes métodos para análise quantitativa da daptomicina injetável foram desenvolvidos e validados: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ensaio microbiológico (método turbidimétrico) e espectrofotometria na região do UV. Todos os métodos foram validados de acordo com as guias vigentes, frente aos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, tendo sido atendidos os requisitos estabelecidos. Os teores médios de daptomicina na formulação em estudo, pelos métodos desenvolvidos (n=12/método) foram:  $100,23 \pm 0,59\%$  (CLAE);  $100,96 \pm 2,58\%$  (ensaio microbiológico) e  $98,98 \pm 1,35\%$  (espectrofotometria no UV). Esses resultados foram comparados pelo teste de ANOVA, que indicou que os métodos de CLAE e microbiológico são intercambiáveis. Pelo estudo de degradação forçada verificou-se que a condição que induz à maior degradação do fármaco é o meio alcalino, sendo que a reação segue cinética de primeira ordem nas condições usadas. Constatou-se ainda que a amostra degradada da daptomicina não tem ação antimicrobiana. Pelas suas características, os métodos de CLAE e microbiológico podem ser usados no controle de qualidade de rotina e em estudos de estabilidade da formulação injetável de daptomicina.

Palavras-chave: daptomicina; validação de métodos; cromatografia líquida de alta eficiência; ensaio microbiológico; cinética de degradação; estabilidade.



## **ABSTRACT**

Master's Degree Dissertation  
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

### **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS TO ASSAY DAPTOMYCIN IN INJECTABLE FORM**

AUTHOR: ANA PAULA CHRIST  
ADVISER: DR<sup>a</sup> ANDRÉA INÊS HORN ADAMS  
Presentation date: Santa Maria, August, 30<sup>th</sup> 2013

This work presents the development and validation of analytical methods to assay daptomycin injection. Daptomycin is a drug of a new class of antibiotics, known as cyclic lipopeptides. It was approved in USA in 2003 and in Brazil in 2009. Up to now, there are no reports about methods to assay the drug in pharmaceutical products, both in scientific literature or in official compendia. Methods to identify daptomycin in raw material were realized as solubility, melting point, infrared spectrophotometry (IR), ultraviolet spectrophotometry (UV) and differential scanning calorimetry (DSC) and they showed appropriate results. The following methods to assay daptomycin injection were developed and validated: high performance liquid chromatography (HPLC), microbiological assay (turbidimetric) and UV-spectrophotometry. All of them were validated according current guidelines, by the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy and robustness, being all the requirements met. The mean values of daptomycin assay by the three methods were:  $100,23 \pm 0,59\%$  (HPLC);  $100,96 \pm 2,58\%$  (turbidimetric assay) and  $98,98 \pm 1,35\%$  (UV-spectrophotometry). They were compared by ANOVA, which indicated that HPLC and turbidimetric assay are interchangeable. The stress testing showed that daptomycin is very susceptible to alkaline medium and that the degradation follows first order kinetic, in the conditions adopted. It was found that the degradation product(s) of daptomycin do not have antimicrobial activity. Considering their characteristics, HPLC and turbidimetric assays can be used in routine quality control and in stability studies of daptomycin injection.

Key words: daptomycin; method validation high performance; liquid chromatography; microbiological assay; degradation kinetic; stability.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1 -</b>	Estrutura química da daptomicina.....	38
---------------------	---------------------------------------	----

### CAPÍTULO I

<b>Figura 4.1 -</b>	Curva de aquecimento obtida por calorimetria exploratória diferencial para a SQR de daptomicina em atmosfera de nitrogênio e velocidade de aquecimento de 10° C/min .....	51
<b>Figura 4.2 -</b>	Espectro na região do UV da SQR de daptomicina, diluída em água na concentração de 25 µg/mL.....	53
<b>Figura 4.3 -</b>	Espectro de absorção na região do UV da daptomicina (MARTENS-LOBENHOFFER et al., 2008).....	53
<b>Figura 4.4 -</b>	Espectros na região do UV da substância química de referência (A) e do injetável (B) diluídos em água, na concentração de 25 µg/mL.....	54
<b>Figura 4.5 -</b>	Espectro na região do infravermelho da daptomicina substância química de referência.....	55
<b>Figura 4.6 -</b>	Cromatograma da substância química de referência (A) e da amostra comercial de daptomicina (B), na concentração de 25 µg/mL.....	57

### CAPÍTULO II

<b>Figure 1 -</b>	Chemical structure of daptomycin.....	65
<b>Figure 2 -</b>	Chromatograms of daptomycin SQR (A) and daptomycin injection (B).....	72
<b>Figure 3 -</b>	LC chromatograms of daptomycin (25µg mL <sup>-1</sup> ). (A) reference substance of daptomycin; (B) UVA radiation; (C) oxidative medium and (D) alkaline medium.....	72
<b>Figure 4 -</b>	Pareto chart of the standardized effects.....	77

## CAPÍTULO II

<b>Figure 1 -</b> Chemical structure of daptomycin.....	86
<b>Figure 2 -</b> DPT assay after alkaline degradation at 0, 30, 60, 90 and 120 minutes of exposure, by turbidimetric bioassay and chromatographic methods.....	98

## CAPÍTULO IV

<b>Figura 7.1 -</b> Espectro obtido para solução de SQR de daptomicina (25 µg/mL)	109
<b>Figura 7.2 -</b> Espectro da daptomicina na região do ultravioleta, em diferentes solventes: (A) água, (B) ácido clorídrico 0,1 M, (C) metanol e (D) hidróxido de sódio 0,1M.....	110
<b>Figura 7.3 -</b> Espectros obtidos para (A) solução de SQR (50 µg/mL) e (B) solução de SQR (50 µg/mL) acrescida de NaOH.....	111

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

<b>Table 1 -</b>	Factors and levels investigated in full factorial design.....	69
<b>Table 2 -</b>	Results of daptomycin reference standard recovery at the injectable daptomycin samples.....	75
<b>Table 3 -</b>	Full factorial design of three factors with optimized conditions points and respective responses.....	76

### CAPÍTULO III

<b>Table 1 -</b>	Conditions tested to establish the turbidimetric assay conditions.....	94
<b>Table 2 -</b>	Precision data of turbidimetric assay to determination of DPT in injection.....	95
<b>Table 3 -</b>	Accuracy of turbidimetric assay to determination of DPT.....	96
<b>Table 4 -</b>	Robustness determination of DPT turbidimetric assay.....	97

### CAPÍTULO IV

<b>Tabela 7.1 -</b>	Preparo das soluções para o ensaio de recuperação.....	107
<b>Tabela 7.2 -</b>	Análise estatística (ANOVA) para 3 curvas analíticas.....	111
<b>Tabela 7.3 -</b>	Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão do método.....	112
<b>Tabela 7.4 -</b>	Valores experimentais do ensaio de recuperação do método de doseamento por espectrofotometria no UV da daptomicina injetável.....	113
<b>Tabela 7.5 -</b>	Valores experimentais obtidos na robustez.....	113

### DISCUSSÃO GERAL

<b>Tabela 8.1 -</b>	Comparação dos métodos de análise por CLAE, microbiológico e espectrofotometria no UV para doseamento da daptomicina.....	121
---------------------	---	-----

<b>Tabela 8.2 -</b>	Cinética de degradação da daptomicina em meio alcalino (NaOH 0,01 M) obtida pelos métodos de CLAE e microbiológico.....	122
---------------------	---	-----

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 3.1</b> - Resumo dos métodos analíticos cromatográficos (CLAE) empregados no doseamento da daptomicina em diferentes fluidos biológicos.....	43
<b>Quadro 3.2</b> - Classificação dos testes segundo sua finalidade (BRASIL, 2003; USP 36, 2013).....	44
<b>Quadro 3.3</b> - Parâmetros de validação segundo a finalidade do método (BRASIL, 2003; USP 36, 2013).....	45

### CAPÍTULO I

<b>Quadro 4.1</b> - Termos descritivos de solubilidade e seu significado.....	50
<b>Quadro 4.2</b> - Frequência de absorção das principais bandas no espectro de infravermelho da daptomicina. Fonte: LOPES; FASCIO, 2004; SILVERSTEIN et al., 2005.....	55
<b>Quadro 4.3</b> - Condições cromatográficas definidas para a identificação da daptomicina por CLAE.....	56

### CAPÍTULO IV

<b>Quadro 8.1</b> Condições estabelecidas para desenvolvimento do método por difusão em ágar.....	120
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância;
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
ATCC	American Type Culture Collection
CAS	Chemical abstracts
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência;
CORE	Cubicin Outcome Registry and Experience
DCB	Denominação comum brasileira;
DPR	Desvio padrão relativo;
DPT	Daptomicina;
DSC	Calorimetria exploratória diferencial;
FDA	Food and Drug Administration;
ICH	International Conference on Harmonisation
IDSA	Infectious Diseases of America
IV	Infravermelho;
r	Coefficiente de correlação de Pearson;
SQR	Substância Química de Referência;
TGA	Análise Termogravimétrica
UV	Ultravioleta.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>33</b>
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Daptomicina</b> .....	<b>37</b>
3.1.1	Aspectos gerais .....	37
3.1.2	Descrição .....	38
3.1.3	Apresentação .....	39
3.1.4	Mecanismo de ação .....	39
3.1.5	Farmacocinética .....	40
3.1.6	Reações adversas .....	41
3.1.7	Resistência .....	41
3.1.8	Determinação quantitativa .....	42
<b>3.2</b>	<b>Validação de métodos analíticos</b> .....	<b>44</b>
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO I – Análise qualitativa da daptomicina SQR</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>49</b>
<b>4.2</b>	<b>Caracterização da daptomicina</b> .....	<b>49</b>
4.2.1	Solubilidade .....	49
4.2.2	Ponto de fusão .....	50
4.2.3	Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	51
4.2.4	Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) .....	52
4.2.5	Espectrofotometria na região do infravermelho (IV) .....	54
4.2.6	Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) .....	56
<b>4.3</b>	<b>Conclusões</b> .....	<b>57</b>
<b>4.4</b>	<b>Referências</b> .....	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>CAPÍTULO II - Development and validation of a stability-indication LC-UV method for determination of daptomycin injectable form and kinetic study in alkaline medium</b> .....	<b>59</b>
	<b>Introduction</b> .....	<b>64</b>
	<b>Experimental</b> .....	<b>65</b>

Chemical and reagents .....	65
Instrumentation and analytical conditions .....	65
Solutions preparation .....	66
Reference substance and sample solutions .....	66
Buffer pH 2.2 .....	66
<b>Method validation .....</b>	<b>66</b>
Specificity .....	66
Alkaline and acidic hydrolysis .....	67
Oxidative condition .....	67
Photodegradation .....	67
Thermal degradation .....	68
Linearity .....	68
Precision .....	68
Accuracy .....	68
Robustness .....	69
Stability standard solution .....	69
System suitability .....	70
Kinetic studies .....	70
Statistical software .....	70
<b>Results and discussion .....</b>	<b>71</b>
Method optimization .....	72
Method validation .....	72
Specificity .....	72
Linearity .....	74
Precision .....	74
Accuracy .....	74
Robustness .....	75
Stability of standard solution .....	77
System suitability .....	77
Kinetic studies .....	77
<b>Conclusion .....</b>	<b>78</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>68</b>
<b>References .....</b>	<b>78</b>

## 6. CAPÍTULO III - Development and validation of stability-indicative



<b>turbidimetric assay to determine the potency of daptomycin in injectable form in presence of degradation products .....</b>	<b>78</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>81</b>
<b>Experimental .....</b>	<b>86</b>
Chemical and reagents .....	87
Preparation of reference substance and sample solutions .....	87
Preparation of calcium stock solution .....	88
Microorganism and inoculum standardization .....	88
Turbidimetric method .....	88
Method validation .....	89
Specificity .....	89
Linearity .....	89
Precision .....	90
Accuracy .....	90
Robustness .....	90
Degradation kinetic in alkaline medium .....	90
HPLC method .....	91
Comparison of methods .....	91
<b>Results and discussion .....</b>	<b>91</b>
Preliminary studies .....	92
Calcium concentration .....	92
Turbidimetric assay .....	93
Specificity .....	93
Linearity .....	94
Precision .....	94
Accuracy .....	95
Robustness .....	96
Kinetic studies .....	96
Comparison of methods .....	97
<b>Conclusions .....</b>	<b>98</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>99</b>
<b>References .....</b>	<b>99</b>
<b>7.    CAPÍTULO IV – Método espectrofotométrico .....</b>	<b>103</b>

<b>7.1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>105</b>
<b>7.2</b>	<b>Experimental .....</b>	<b>105</b>
7.2.1	Substâncias químicas, amostra e reagentes .....	105
7.2.2	Equipamento .....	106
7.2.3	Preparo das soluções SQR e amostra .....	106
7.2.4	Validação do método analítico .....	106
7.2.4.1	Especificidade .....	106
7.2.4.2	Linearidade .....	107
7.2.4.3	Exatidão .....	107
7.2.4.4	Precisão .....	108
7.2.4.5	Robustez .....	108
7.2.4.6	Análise estatística .....	108
<b>7.3</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>109</b>
7.3.1	Otimização do método .....	109
7.3.2	Validação do método .....	110
7.3.2.1	Especificidade .....	110
7.3.2.2	Linearidade .....	111
7.3.2.3	Precisão .....	112
7.3.2.4	Exatidão .....	112
7.3.2.5	Robustez .....	113
<b>7.4</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>114</b>
<b>7.5</b>	<b>Referências .....</b>	<b>114</b>
<b>8.</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>117</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>125</b>
<b>10.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>129</b>





## 1. INTRODUÇÃO

Nos anos 30, quando os primeiros antibióticos, como a penicilina, começaram a ser usados na clínica, foram saudados como “fármacos milagrosos” e tornaram-se o principal avanço na área médica do século XX (SIMMONS et al., 2010; EOM et al., 2013). Desde então, o sucesso da terapia antimicrobiana se reflete no uso continuado destas substâncias associado à diminuição da mortalidade e morbidade das infecções bacterianas (FERNANDES 2006). Porém, esse sucesso terapêutico sofre uma grande ameaça: o aumento da resistência dos microrganismos frente aos antimicrobianos e o grande número de microrganismos multirresistentes, que são considerados uma ameaça à saúde pública no mundo todo (EOM et al., 2013).

Os microrganismos tornam-se resistentes por sua habilidade de adaptação aos agentes antimicrobianos. Na presença dos mesmos, desenvolvem mecanismos sofisticados para inativar esses agentes e fazem isso em uma taxa que excede em muito o ritmo de desenvolvimento de novos medicamentos (HANCOCK 2007; EOM et al., 2013). Algumas estratégias podem ser adotadas para evitar esse problema: prevenção das infecções bacterianas com o uso de vacinas, uso racional de antibióticos, controle e prevenção da disseminação de microrganismos resistentes e desenvolvimento de novos antibióticos (GUIMARÃES et al., 2010).

Ao longo das últimas décadas, o número de novos fármacos e indústrias farmacêuticas que produzem antibióticos vem decrescendo (BOUSCHER et al., 2013; EOM et al., 2013). Nos últimos dez anos, apenas três antibióticos com novos mecanismos de ação foram aprovados para comercialização: daptomicina (2003), tigeciclina (2005) e telavancina (2009). Outros antibióticos com mecanismos de ação já existentes também foram aprovados: gemifloxacino (2003), telitromicina (2004), doripenem (2007) e deftarolima fosamil (2010). Além destes antibióticos já disponíveis para comercialização, alguns outros se encontram em fase III de desenvolvimento: plazomicin, eravaciclina, brilacidina e friulimicina, sendo que destes, apenas a friulimicina apresenta mecanismo de ação inovador (BOUSCHER et al., 2013). Fármacos com novos mecanismos de ação apresentam vantagens no combate a microrganismos resistentes e à emergência de novos patógenos (GUIMARÃES et al., 2010).

A daptomicina pertence a uma nova classe de antibióticos conhecidos como lipopeptídeos cíclicos e possui um mecanismo de ação distinto dos outros antimicrobianos disponíveis no mercado (SAUERMANN et al., 2008). Foi aprovada em 2003 pela *Food and*

*Drug Administration* (FDA) para uso nos Estados Unidos, em 2006 para uso na Europa e em 2009 foi aprovada junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para comercialização no Brasil (SAKOULAS, 2009). Possui ação frente a microrganismos gram-positivos de importância clínica, incluindo cepas multirresistentes, porém não é ativa frente a bactérias gram-negativas (SILVERMAN et al., 2001, GIKAS et al., 2009).

Por se tratar de um fármaco de comercialização relativamente recente e, portanto, sem monografias em compêndios oficiais, a daptomicina foi escolhida para o desenvolvimento dos métodos analíticos propostos neste trabalho. Existem na literatura diversos métodos voltados ao doseamento do antibiótico em fluidos biológicos, porém, nenhum voltado à determinação do fármaco em sua forma farmacêutica.

Métodos analíticos são essenciais para a indústria farmacêutica, seja na identificação, quantificação, nos ensaios de dissolução, estudos de estabilidade ou na análise de fármacos em matérias-primas, produtos farmacêuticos e matrizes biológicas. O objetivo da validação de métodos é demonstrar que os mesmos são adequados para a finalidade pretendida, ressaltando que os mesmos devem permitir uma análise completa do produto (ICH 2005; WATSON, 2005).

A ausência de métodos disponíveis para o controle de qualidade da daptomicina motivou o desenvolvimento dos métodos analíticos propostos neste trabalho, visando a contribuir para o conhecimento de características físico-químicas do fármaco, ações de farmacovigilância e garantia da qualidade.







## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver e validar métodos analíticos para o controle de qualidade da daptomicina na sua forma farmacêutica e realizar estudos de estabilidade intrínseca do fármaco.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar a análise qualitativa da daptomicina como matéria-prima;
- Desenvolver e validar os seguintes métodos para análise quantitativa da daptomicina em sua forma farmacêutica: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ensaio de potência de antibióticos e espectrofotometria na região do ultravioleta (UV);
- Verificar a intercambialidade dos métodos propostos.
- Submeter o fármaco a condições de degradação forçada, como: hidrólise ácida e básica, fotólise, oxidação e calor, a fim de verificar as condições que afetam sua estabilidade;







### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Daptomicina

##### 3.1.1 Aspectos gerais

A síntese da daptomicina ocorreu na década de 80, sendo inicialmente denominada como LY 146032. Pertence ao grupo dos lipopeptídeos cíclicos, produzida a partir de uma cepa de actinomiceto conhecida como *Streptomyces roseosporus* (ELIOPOULOS et al., 1986; DEBONO et al., 1987).

Há cerca de pelo menos outros dez lipopeptídeos estruturalmente relacionados à daptomicina, todos metabólitos secundários de actinomicetos. Dentre eles pode-se destacar a friulimicina e a anfomicina (BALTZ et al., 2005). A friulimicina ainda não foi aprovada para comercialização pelo FDA, estando em Fase III dos estudos pré-clínicos (GUIMARÃES et al., 2010; REDER-CHRIST et al., 2011) e a anfomicina é usada exclusivamente na indústria veterinária (WANG et al., 2011). Segundo Baltz e colaboradores (2005), a classe dos antibióticos lipopeptídeos fornece oportunidades para desenvolver novas moléculas relacionadas com a daptomicina com propriedades e/ou espectro de atividade melhorados.

A daptomicina possui rápida atividade bactericida *in vitro* frente a cepas de microrganismos gram-positivos de importância clínica incluindo estreptococos, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, enterococos resistentes à vancomicina, *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina, entre outros (SILVERMAN et al., 2001), mas não possui atividade frente a bactérias gram-negativas por ser incapaz de penetrar em suas membranas (GIKAS et al., 2009).

Foi aprovada em 2003 inicialmente para uso no tratamento de infecções complicadas da pele e tecidos moles; em 2006 passou também a ser usada no tratamento de bacteremias causadas por *S.aureus* e endocardites (VERDIER et al., 2011). Nos EUA, atualmente, existe o CORE (*Cubicin Outcome Registry and Experience*), um banco de dados pós-comercialização que traz os resultados da terapia com daptomicina. Dados já disponíveis mostram que a daptomicina vem sendo usada também para outras patologias, como artrite séptica, infecções do trato urinário, infecções do sistema nervoso e infecções necrosantes (SAKOULAS, 2009).

### 3.1.2 Descrição

*Denominação química:* N-decanoil-L-triptofil-D-asparaginil-L-aspartil-L-treonilglicil-L-ornitil-L-aspartil-D-alanil-L-aspartiglicil-D-seril-treo-3-metil-L-glutamil-3-antranoil-L-alanina-1-lactona.

*DCB:* daptomicina

*CAS:* 103060-53-3

*Fórmula molecular:*  $C_{72}H_{101}N_{17}O_{26}$

*Estrutura química:* Ver Figura 3.1

*Massa molecular:* 1620,67

*pkas:* 4,0 e 10,0

*Características físico-químicas:* pó amarelo pálido a amarelo escuro.

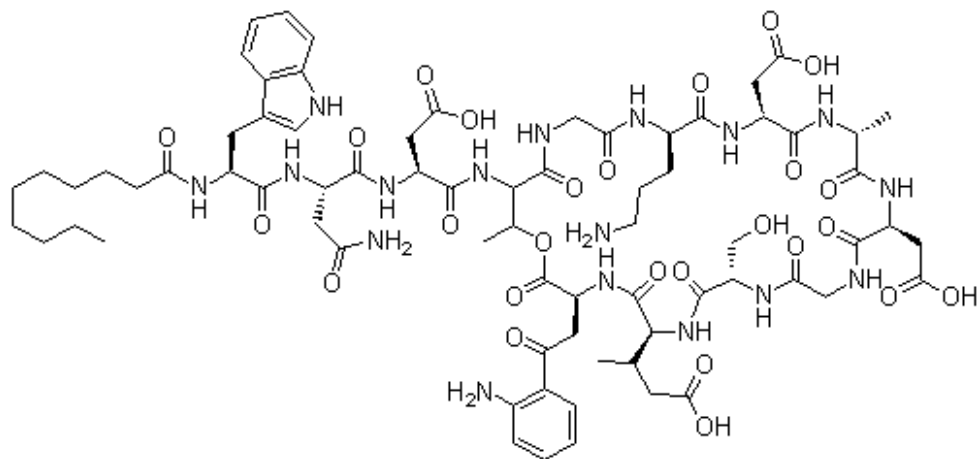


Figura 3.1 – Estrutura química da daptomicina

### 3.1.3 Apresentação

A daptomicina é comercializada exclusivamente para uso na forma intravenosa, para injeção ou infusão e sua administração é restrita ao ambiente hospitalar e a pacientes adultos. É encontrada em frascos-ampola na concentração de 500 mg, em embalagens contendo 1 ou 5 frascos-ampola. O único excipiente presente na formulação é o hidróxido de sódio, que corresponde a aproximadamente 10% da massa do produto. É recomendando que seja armazenada em temperaturas entre 2 e 8°C (CUBICIN, 2011).

### 3.1.4 Mecanismo de ação

A daptomicina possui um mecanismo de ação distinto dos outros antimicrobianos disponíveis até então (THORNE; ALDER 2002). Nos primeiros anos após sua síntese seu mecanismo de ação era desconhecido; a única certeza era a necessidade do cálcio (ELIOPOULOS et al., 1986). Atualmente, sabe-se que a daptomicina age através da sua inserção, dependente de cálcio, na membrana citoplasmática das bactérias. Jung e colaboradores (2004) estudaram a importância do cálcio na atividade deste antibiótico, demonstrando que na ausência de cálcio a concentração inibitória mínima (CIM) era maior que 64 µg/mL enquanto com 0,34; 2 e 5 mM de cálcio a CIM decaiu para 2; 1 e 0,625µg/mL, respectivamente.

O cálcio se liga entre dois resíduos de aspartato, diminuindo a carga total da molécula e aumentando a área de superfície hidrofóbica, permitindo que a daptomicina possa interagir melhor com as membranas. Além disso, os íons cálcio promovem a inserção mais profunda da molécula de daptomicina na membrana bacteriana, eliminando a carga negativa residual dos aminoácidos da daptomicina e da carga negativa dos fosfolipídios, normalmente encontrada na membrana das bactérias gram-positivas (HANCOCK, 2005).

A daptomicina causa um efluxo dos íons potássio e interage com vesículas de fosfolipídios, causando despolarização da célula bacteriana. Essa despolarização por si só não é letal: a valinomicina, que causa despolarização da célula em presença de íons potássio, possui efeito bacteriostático. No entanto, na ausência de uma força motriz as células não conseguem sintetizar ATP ou obter os nutrientes necessários para o crescimento. Finalmente, o real mecanismo de ação da daptomicina não está totalmente elucidado, mas parece envolver múltiplas atividades incluindo os efeitos sobre a integridade da membrana, inibição da síntese

do ácido lipoteicóico, inibição de proteínas e síntese de DNA e RNA, entre outros (JUNG et al., 2004; HANCOCK, 2005).

### 3.1.5 Farmacocinética

A farmacocinética é normalmente linear, quando administrada em doses de 1 a 8 mg/kg/dia. Possui uma meia-vida de eliminação de cerca de 9 horas, o que justifica sua administração diária (THORNE; ALDER, 2002; WISE et al., 2002; FALCONE et al., 2013). Estudos demonstram que há baixa probabilidade de efeitos adversos relacionados ao acúmulo do fármaco no organismo (CHA et al., 2003). Liga-se reversivelmente às proteínas plasmáticas (90-96%) em indivíduos saudáveis, mas a ligação tende a ser menor (84-88%) em indivíduos com insuficiência renal significativa (CUBICIN, 2011; WENISCH et al., 2012).

O antibiótico distribui-se primariamente no plasma, com pequeno volume de distribuição (0,1 L/Kg) e penetração no tecido vascular. Não atravessa as barreiras hematoencefálica e placentária de indivíduos normais; no entanto, em coelhos com meningite causada por *Streptococcus pneumoniae*, 5% da concentração plasmática foi detectada no fluido cérebro-espinhal (DVORCHIK et al., 2003; STENBERGEN et al., 2005).

A daptomicina é excretada principalmente pelos rins, na forma inalterada, sendo então observadas alterações no *clearance* de pacientes com problemas renais (BURKHARDT et al., 2008). A eliminação renal ocorre principalmente por filtração glomerular sem secreção tubular significativa ou reabsorção (WENISHC et al., 2012). Falcone e colaboradores (2013) conduziram um estudo no qual observaram que na presença de dano severo na função renal há uma significativa redução do *clearance* com um consequente aumento da meia vida de eliminação. Desta forma, em pacientes com danos renais o intervalo de dose recomendado é de 48 horas (STENBERGEN et al., 2005; BURKHARDT et al., 2008). Doenças que incluem acúmulo de líquido, como ascite e edema, diabetes, hipertensão e insuficiência cardíaca, não estão significativamente relacionadas com a depuração da daptomicina (DVORCHIK, 2004).

Pelo fato de não ser metabolizado pelo sistema do citocromo P450 ou outras enzimas hepáticas e possuir mecanismo de ação único, não são apresentadas interações medicamentosas antagônicas (STENBERGEN et al., 2005).



### 3.1.6 Reações adversas

As reações adversas comumente relatadas para o uso da daptomicina incluem anemia, constipação, diarreia, náusea, vômito, dores de cabeça, dispepsia, infecções fúngicas e reações no local da injeção. Com menor frequência podem aparecer efeitos adversos na musculatura esquelética que podem aparecer como aumento na creatina fosfoquinase (CPK), dor e fraqueza musculares (STENBERGEN et al., 2005; SAUERMAN et al, 2008; CUBICIN, 2011).

Em um estudo realizado com 550 pacientes que receberam administração de daptomicina, 12% relataram o aparecimento de algum efeito colateral sendo a maioria aumento na CPK, astenia e diarreia, considerados leves ou moderados. Neste mesmo estudo, 17 pacientes descontinuaram o tratamento devido ao aparecimento de algum efeito adverso mais severo, incluindo aumento na CPK em 10 vezes o seu nível normal. Efeitos adversos mais severos foram encontrados em cerca de 3% dos pacientes sendo eles aumento nos níveis de potássio sanguíneo, hemorragia vaginal e rabdomiólise. Ainda neste estudo, dois pacientes vieram a óbito, porém sem relação clara com a administração do antibiótico. Após a suspensão da administração de daptomicina a maioria das reações adversas foi controlada (SEATON et al., 2013). A bula do medicamento informa sobre alguns efeitos adversos relatados no período de pós-comercialização, como: erupções cutâneas, pneumonia eosinófila, aumento da mioglobina e neuropatia periférica, mas apenas em casos isolados (CUBICIN, 2011).

### 3.1.7 Resistência

A CIM para 90% dos patógenos avaliados por Wenisch e colaboradores (2011) é de 1 mg/L, com exceção de enterococos, onde varia de 2 a 4 mg/L. A incidência de resistência em isolados clínicos de *S. aureus* frente à daptomicina é muito baixa e as cepas resistentes exibem pouco aumento na CIM (BALTZ, 2009). Dortet e colaboradores (2013) relataram o aumento da CIM para 2 mg/mL em 6 pacientes tratados apenas com daptomicina, na ausência de exposição anterior à vancomicina. Neste mesmo estudo também descreveram o primeiro caso de resistência frente à daptomicina durante tratamento de endocardite causada por *S. aureus*.

### *3.1.8 Determinação quantitativa*

Normalmente, os primeiros métodos analíticos desenvolvidos para doseamento de fármacos são voltados aos estudos de farmacocinética. Na literatura são relatados diversos métodos voltados ao doseamento da daptomicina em fluidos biológicos, todos eles consistem em métodos cromatográficos e estão sumarizados no Quadro 3.1.

O método descrito por Tobin e colaboradores (2008) para doseamento do antibiótico no soro foi posteriormente empregado no doseamento de nanolipossomas de daptomicina, desenvolvidos para uso tópico em infecções complicadas da pele (LI et al., 2013). Martens-Lobenhoffer (2008) desenvolveram e validaram uma metodologia para doseamento da daptomicina em plasma e um estudo de 2012 utilizou este mesmo método para doseamento do antibiótico em plasma durante hemofiltração venovenosa contínua, com o objetivo de verificar as doses adequadas para pacientes nessa condição (WENISCH et al., 2012).

Aplicação	Coluna	Fase Móvel	Deteção	Autores
Soro	C8	38% ACN e 62% fosfato monobásico de amônio, pH 3,5	UV, 226nm	RYBAK et al.,1992
Plasma	C8 (250 mm x 4,6 mm Phenomenex IB-SIL 5)	90% solvente A: ACN 0.5% NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (34:66vol/vol) e 10% solvente B: ACN 0,5% NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (20:80, v/v)	UV, 214nm	DVORCHIK et al., 2003
Soro	C18	Fosfato de amônio 0,5% e ACN (66:34 v/v)	UV, 220nm	DERYKE et al., 2006
Plasma	C8 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm-Zorbax Eclipse)	Solução tampão (20 mM TFA e 15 mM trietilamina): ACN pH 3,5	UV, 224nm	MARTENS-LOBENHOFFER et al., 2008
Soro	C18 (100 mm x 4,6 mm)	Tampão fosfato: ACN pH 5,5 (70:30 v/v)	UV, 223nm	TOBIN et al., 2008
Sangue	C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm)	Solvente A: Água 0,1% TFA e solvente B: MeOH	UV, 220nm	GIKAS et al., 2009
Plasma	C18 (250 mm x 4,6 mm Phenomenex Synergi)	Tampão A: água e ácido fórmico 0,05% e Tampão B: ACN e ácido fórmico 0,05%	Detector de massas	BAIETTO, et al. 2010
Sangue, urina e líquido peritoneal	C18 (50 mm x 4,6 mm, 4 µm- Phenomenex Synergi )	Solvente A: água e ácido fórmico 0,1% e solvente B: ACN e ácido fórmico 0,1%	UV, 370nm	GIKA et al., 2010
Sangue	C8 (150 mm x 2,1mm)	Solvente A: 0,08% ácido fórmico em água; Solvente B: 0,08% ácido fórmico em ACN	UV, 219 nm	OLSZOWY et a., 2010
Plasma	C18 (50 mm x 2,1 mm, 3 µm-Hypersil Gold)	Ácido fórmico 0,1%: água: ACN (10:70:20 v/v/v)	Detector de massas	VERDIER et al., 2011
Plasma	C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm – Waters Acquity)	Solvente A: 0,1% ácido fórmico em água e Solvente B:0,1% ácido fórmico em ACN	Detector de massas	BAZOTI et al., 2011

TFA: ácido trifluoracético; ACN: acetonitrila; MeOH: metanol; NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato de amônio monobásico

Quadro 3.1 – Resumo dos métodos analíticos cromatográficos (CLAE) empregados no doseamento da daptomicina em diferentes fluidos biológicos

### 3.2 Validação de métodos analíticos

Durante as diversas fases de desenvolvimento farmacêutico, como nos estudos de estabilidade e de controle de qualidade, é essencial que sejam desenvolvidos métodos analíticos confiáveis e validados. A International Conference on Harmonization (ICH) recomenda que os métodos analíticos aplicados a novas substâncias sejam validados e adequados para a detecção e a quantificação de produtos de degradação. Além disso, devem ser capazes de demonstrar que as impurezas próprias do fármaco não interferem ou são separadas dos produtos de degradação presentes na matéria-prima (BAKSHI; SINGH, 2002; ICH 2005).

Estudos de validação de métodos analíticos são realizados para assegurar a credibilidade dos mesmos, demonstrando que eles são adequados para a aplicação pretendida (ICH, 2005; USP 36, 2013). A classificação dos métodos analíticos, de acordo com sua finalidade é descrita no Quadro 3.2.

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

Quadro 3.2 – Classificação dos testes segundo sua finalidade (BRASIL, 2003; USP 36, 2013)

No Quadro 3.3, são apresentados os parâmetros analíticos que devem ser determinados de acordo com a categoria do método.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Sim	Não
	Intermediária	**	**	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.

Quadro 3.3 – Parâmetros de validação segundo a finalidade do método (BRASIL, 2003; USP 36, 2013)

A descrição dos parâmetros que podem ser avaliados na validação de um método, segundo a ICH (2005), USP 36 (2013) e a Resolução nº 899 (BRASIL, 2003), é a seguinte:

✓ *Especificidade*: um método específico é capaz de analisar a substância de interesse sem que outros componentes que possam estar presentes no produto, como excipientes, produtos de degradação ou impurezas, interfiram na determinação.

✓ *Linearidade*: é a capacidade do método em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo conhecido e especificado.

✓ *Precisão*: avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: repetibilidade (mesmo analista e instrumentação), precisão intermediária (mesmo laboratório, porém analista, dia ou equipamento diferente) e reprodutibilidade (laboratórios diferentes).

✓ *Exatidão*: grau de proximidade entre os resultados individuais encontrados e o valor aceito como referência.

✓ *Limite de detecção*: concentração mais baixa da substância em exame que pode ser detectada na amostra, mas não obrigatoriamente quantificada, sob as condições experimentais especificadas;

✓ *Limite de quantificação*: concentração mais baixa da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais especificadas;

✓ *Robustez*: um método robusto não é afetado por pequenas modificações nas condições de análise. Podem ser avaliados alguns fatores como: influência do tempo de extração, estabilidade das soluções analíticas, influência de alterações na temperatura de análise, na proporção de solventes, da procedência dos mesmos, entre outros, dependendo também do método empregado.







## 4.1 Introdução

No controle de qualidade de matérias-primas e formas farmacêuticas é necessária a realização de testes de identificação do fármaco, além de sua quantificação. A identificação de fármacos pode ser realizada através de métodos instrumentais, como ponto de fusão, espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e do infravermelho (IV), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), poder rotatório, CLAE e não instrumentais, como a CCD.

Considerando que a daptomicina (DPT) não possui monografia farmacopeica, este estudo teve por objetivo realizar a caracterização da matéria-prima usada como substância química de referência (SQR) através da análise da solubilidade, da determinação do ponto de fusão (método capilar e DSC) e análise dos espectros de absorção no UV e IV. Realizou-se também a identificação da DPT na sua forma farmacêutica mediante a espectrofotometria na região do UV e CLAE.

## 4.2 Caracterização da daptomicina

A SQR utilizada no desenvolvimento deste trabalho foi produzida pela Hisun Pharmaceutical (Xukow Town, China) e gentilmente cedida pela Cristália (Itapira, São Paulo). A amostra empregada consistiu em frascos-ampola na concentração de 500 mg de DPT, comercializada sob o nome de Cubicin<sup>®</sup> (Novartis), lote 900403FL com validade até 05/13. Para diluição das amostras e SQR, bem como na preparação das soluções foi utilizada água ultrapura.

### 4.2.1 Solubilidade

O ensaio de solubilidade foi desenvolvido conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira (2010). Os solventes utilizados foram acetonitrila, metanol, etanol, água ultrapura, hidróxido de sódio 0,1 M e ácido clorídrico 0,1 M.

A solubilidade aproximada é designada por termos descritivos cujos significados estão relacionados no Quadro 4.1 (FB 5, 2010), sendo que, nesse caso, a expressão “partes” refere-se à dissolução de 1 g de fármaco no número de mililitros dos solventes estabelecidos no

número de partes. Os volumes foram ajustados para massa de amostra de cerca de 10 mg e as análises foram realizadas à temperatura ambiente.

Solvente	Termo descritivo
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10 000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10 000 partes

Quadro 4.1 – Termos descritivos de solubilidade e seu significado

A SQR apresentou-se solúvel em água, metanol, etanol, ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M e praticamente insolúvel em acetonitrila. Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), a solubilidade não deve ser tomada no sentido estrito da constante física, porém complementa e corrobora com outros ensaios podendo ter um valor definitivo se a amostra em questão não apresentar solubilidade mínima, principalmente em água.

#### 4.2.2 Ponto de fusão

A determinação do ponto de fusão foi realizada em equipamento Gehaka, modelo PF 1500. As amostras foram inseridas em tubos capilares com diâmetro de 1 mm e 6 mm de comprimento. Em seguida, os capilares foram introduzidos na célula de aquecimento do equipamento. O ponto de fusão foi determinado visualmente, observando a fusão da substância. O ensaio foi realizado em triplicada.

O valor experimental encontrado foi de 189,8°C, sendo que não foi encontrada na literatura ou no laudo do laboratório produtor nenhuma referência para o ponto de fusão da daptomicina.

#### 4.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC-differential scanning calorimetry) é um método de análise térmica que determina as diferenças entre fluxos de calor de uma amostra contra uma célula de referência (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002). Os métodos térmicos de análise são ferramentas importantes no desenvolvimento de medicamentos. São técnicas precisas e exatas, que necessitam de poucas quantidades de amostra e podem fornecer informações detalhadas sobre novos fármacos (CLAS et al., 1999).

Esta técnica é frequentemente preferida devido à sua capacidade em fornecer informações detalhadas sobre propriedades físicas e energéticas de uma substância. A DSC fornece a temperatura de fusão com a exatidão que métodos clássicos podem não oferecer, além de indicar alguma impureza presente na amostra determinando se sofreu alguma degradação, decomposição ou conversão polimórfica durante o processo (CLAS et al., 1999).

Para realizar o ensaio transferiu-se cerca de 2 mg de daptomicina SQR para o porta amostra de alumínio que foi selado e colocado no forno do calorímetro exploratório. A velocidade de aquecimento aplicada foi de 10 C°/min, dentro de uma faixa de 25 a 250°C, empregando N<sub>2</sub> como gás de arraste.

As análises foram realizadas em calorímetro exploratório diferencial por fluxo de calor, TA-Instruments DSC Q2000, o qual foi previamente calibrado com índio e zinco. A Figura 4.1 representa a curva de aquecimento obtida por DSC para a SQR da daptomicina.

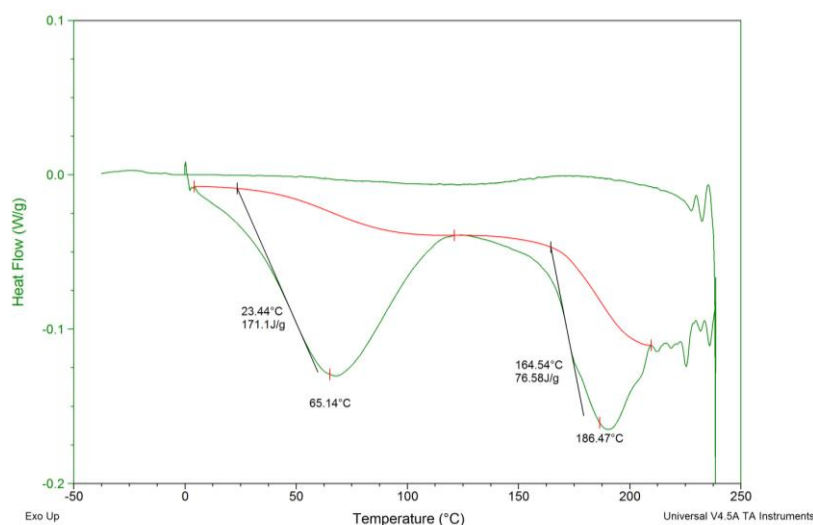


Figura 4.1 Curva de aquecimento obtida por calorimetria exploratória diferencial para a SQR de daptomicina em atmosfera de nitrogênio e velocidade de aquecimento de 10° C/min

Observou-se na curva de DSC da DPT dois eventos endotérmicos: o primeiro com temperaturas de 23,44°C (*onset*) e 65,14°C (*peak*) que pode estar relacionado à perda de água da SQR. O segundo com temperaturas de 164,54°C (*onset*) e 186,47°C (*peak*), correspondente à fusão da SQR. O calor de fusão envolvido na reação foi de 76,56 J/g, ou seja, foram necessários 76,56 J para fundir 1 g da amostra.

A temperatura de fusão obtida (186,47°C) foi inferior ao resultado encontrado na determinação do ponto de fusão pelo método capilar (189,8°C). A DSC é uma técnica mais avançada e mais sensível, na qual a temperatura de fusão da amostra é determinada instrumentalmente, ao contrário do ponto de fusão, onde a fusão do sólido é determinada visualmente, no equipamento usado. Para maiores conclusões a respeito da intercambialidade das técnicas, é aconselhável que determinações adicionais com outras matérias-primas do fármaco sejam feitas.

#### 4.2.4 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A espectrofotometria na região do UV aplica-se à identificação e quantificação de fármacos, apesar de apresentar algumas limitações como a necessidade da existência de grupos cromóforos em sua estrutura. Entretanto, apresenta-se como um método alternativo de doseamento na ausência de equipamentos mais sofisticados, como o cromatógrafo a líquido de alta eficiência (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2001).

Os máximos de absorção na região do UV foram determinados através da diluição da DPT SQR em água, na concentração de 25µg/mL, na faixa de 200-400 nm. Os espectros foram traçados em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800, equipado com cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

A Figura 4.2 mostra o espectro de absorção da DPT em água. Observou-se que o fármaco apresenta três máximos de absorção: 223, 261 e 360 nm.

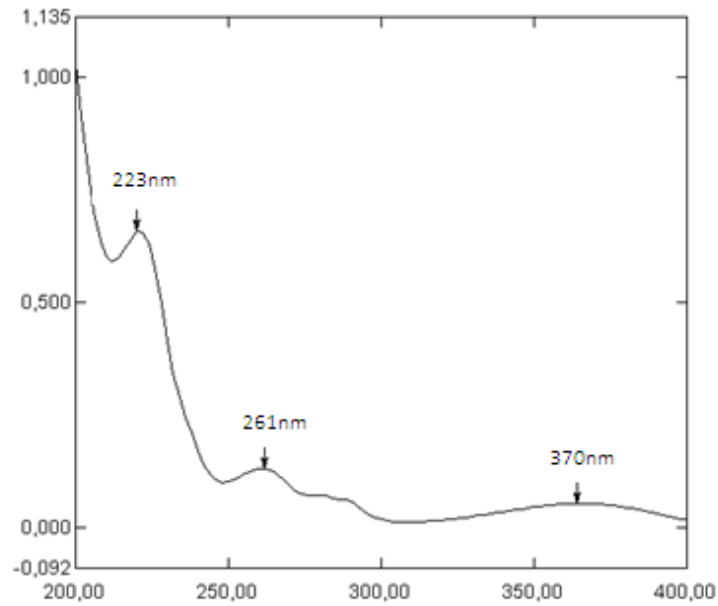


Figura 4.2 - Espectro na região do UV da SQR de daptomicina, diluída em água na concentração de 25 µg/mL

Martens-Lobenhoffer e colaboradores (2008) apresentam um espectro de absorção da daptomicina na faixa de 200 a 700 nm (Figura 4.3), sendo esta a única referência encontrada na literatura. O perfil do espectro de absorção obtido para SQR (Figura 4.2) apresenta-se semelhante ao apresentado na Figura 4.3 e é possível observar comprimentos de onda próximos obtidos para os máximos de absorção nos dois espectros.

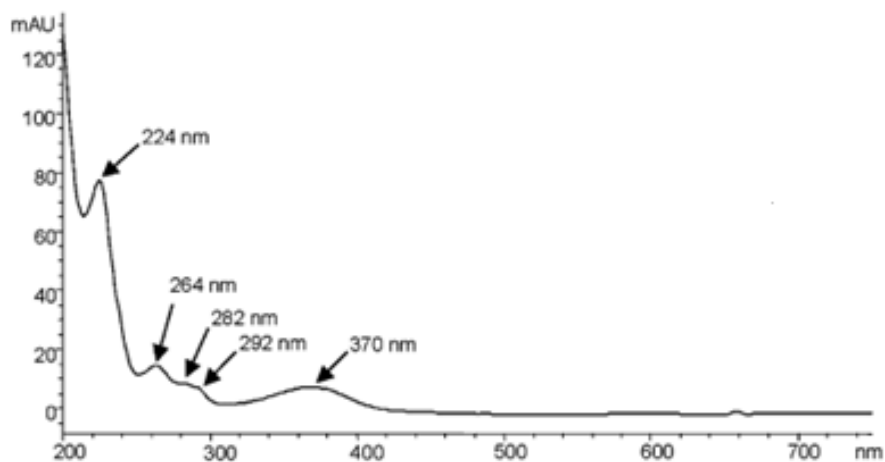


Figura 4.3 – Espectro de absorção na região do UV da daptomicina (MARTENS-LOBENHOFFER et al., 2008)

Também foi realizada a varredura da solução injetável, nas mesmas condições descritas anteriormente, cujos espectros na região do UV encontram-se representados na Figura 4.4. Pode-se inferir que a identificação da DPT presente na amostra comercial foi positiva, uma vez que seu espectro foi semelhante ao da DPR SQR.

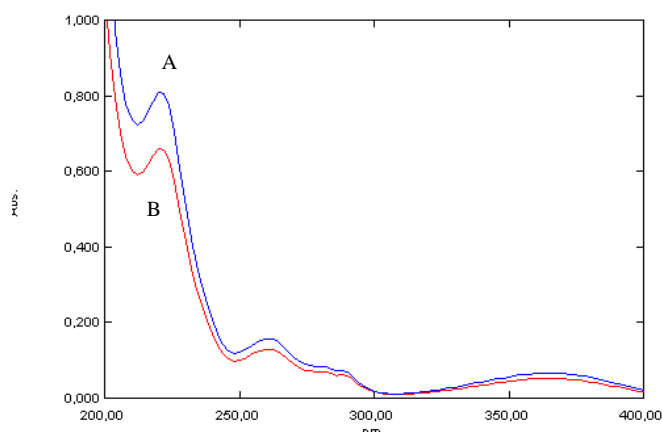


Figura 4.4 – Espectros na região do UV da substância química de referência (A) e do injetável (B) diluídos em água, na concentração de 25 µg/mL

#### 4.2.5 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

A radiação infravermelha (IV) corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das micro-ondas, sendo a porção de maior utilidade a que está situada entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ . Mesmo uma molécula muito simples pode apresentar um espectro muito complexo e, embora o mesmo seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independente da estrutura da molécula. A presença dessas bandas características permite, através do exame do espectro e consulta a literatura, a identificação das estruturas (SILVERSTEIN, WEBSTER, KJEMLE, 2005).

Os espectros na região do infravermelho da daptomicina SQR e amostra comercial foram obtidos utilizando-se espectrofotômetro FTIR, marca Perkin Elmer, modelo Spectrum One. A pastilha destinada à análise foi preparada pela dispersão da substância em brometo de potássio (1,5 mg de fármaco e 150 mg de brometo de potássio) seguida de compressão.

Na ausência de um espectro de IV da DPT para fins de comparação, a atribuição das bandas foi efetuada considerando a região de absorção e a intensidade das mesmas,

comparando os valores com valores encontrados na literatura. A Figura 4.5 apresenta o espectro de IV da DPT SQR e o Quadro 4.2 as atribuições das principais bandas de absorção deste fármaco. O formato das bandas é diferente do observado para a maioria dos fármacos, o que foi atribuído ao tamanho da molécula e ao fato de que há vários grupos funcionais que se repetem.

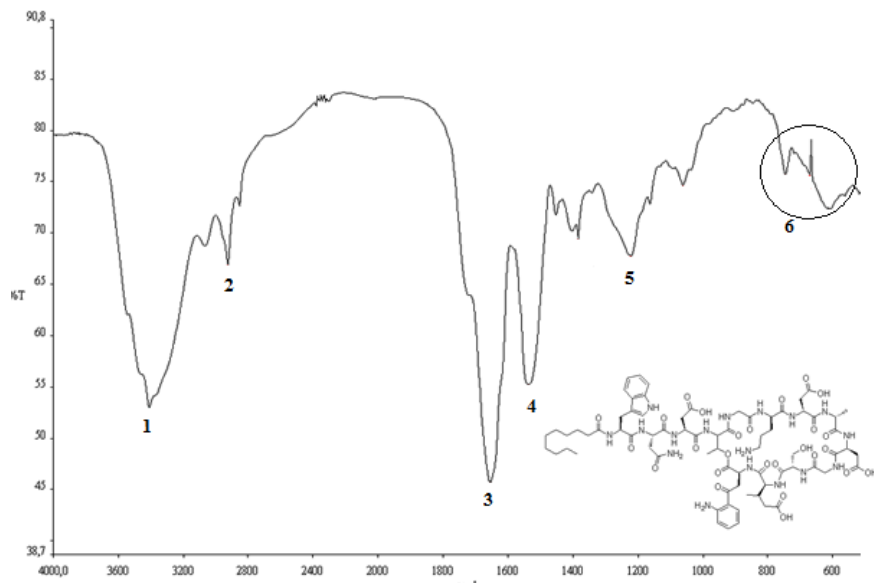


Figura 4.5–Espectro na região do infravermelho da daptomicina substância química de referência

Banda	Frequência	Atribuição
1	3411	Deformação axial de N-H
2	2928	Deformação axial assimétrica de C-H metila
3	1654	Deformação axial C=O (Banda de amida I)
4	1536	Deformação angular de N-H (Banda de amida II)
5	1223	Deformação angular no plano de C-H aromático
6	770 a 690	Carbono aromático substituído em Orto

Quadro 4.2 – Frequência de absorção das principais bandas no espectro de infravermelho da daptomicina. Fonte: LOPES; FASCIO, 2004; SILVERSTEIN et al., 2005

#### 4.2.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Apesar de ser um método bastante empregado em análises quantitativas, a CLAE pode ser muito útil também na identificação de fármacos, através da comparação dos tempos de retenção da amostra e da SQR, quando analisados sob as mesmas condições.

As análises de identificação por CLAE foram realizadas através da aplicação do método validado para a análise quantitativa, em cromatógrafo a líquido Shimadzu constituído de bomba LC-20AT, detector de arranjo de fotodiodos (DAD) SPD-M20A, controlador de sistema CBM-20A, degaseificador DGU-20A5 e injetor manual de 20µL. A aquisição e análise dos dados foram efetuadas através do Software LC-SOLUTION.

As condições cromatográficas definidas para identificação da DPT por CLAE são descritas no Quadro 4.3.

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>
<b>Fase Móvel</b>	Metanol:Acetonitrila:Tampão Fosfato 0,01M pH 2,2 , (40:30:30, v/v/v)
<b>Fluxo</b>	1mL/min
<b>Coluna</b>	Waters XBridge C18 (250 x 4,6 mm, 4µm)
<b>Deteção</b>	UV, em 223 nm
<b>Temperatura</b>	Ambiente ( $\pm 21^{\circ}\text{C}$ )

Quadro 4.3 – Condições cromatográficas definidas para a identificação da daptomicina por CLAE

As soluções padrão e amostra foram preparadas pela dissolução de cerca de 10 mg da SQR e da amostra comercial em água ultrapura, obtendo uma concentração final de 100 µg/mL. Estas soluções foram diluídas a concentração de trabalho (25 µg/mL) com a fase móvel. Os cromatogramas obtidos com o detector de arranjo de fotodiodos (DAD) das soluções referência e amostra estão representados na Figura 4.6.

O método por CLAE fornece elevada seletividade na identificação de componentes de uma amostra, garantindo identidade das substâncias desde que haja uma substância de referência. A sobreposição dos picos do analito no tempo de retenção aproximado de 6,1 minutos (Figura 4.6) e a sobreposição dos espectros de UV, obtidos pelo DAD indicou que os picos referem-se à mesma substância. O índice de pureza maior que 0,9999 demonstrou não haver presença de impurezas nos picos.



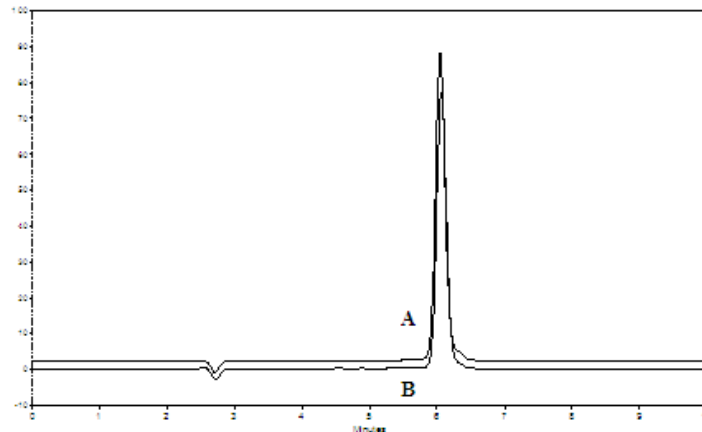


Figura 4.6 – Cromatograma da substância química de referência (A) e da amostra comercial de daptomicina (B), na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$

### 4.3 Conclusões

- A daptomicina apresentou solubilidade em praticamente todos os solventes testados, exceto na acetonitrila. Esse ensaio foi importante já que permitiu escolher o solvente mais adequado para solubilizar a fármaco nos ensaios subsequentes;
- Os valores de ponto de fusão obtidos por DSC e pelo método capilar, foram próximos entre si. Por DSC ainda foi possível constatar que a SQR apresenta uma provável perda de água anterior à fusão;
- Apesar de ser uma molécula bastante complexa, o espectro obtido por IV demonstrou que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de daptomicina;
- O único dado encontrado na literatura para comparação com os valores experimentais foi o espectro no UV, sendo que os espectros da SQR, do injetável e da literatura foram semelhantes, possibilitando a identificação das amostras em análise.
- As análises por UV e CLAE permitiram a identificação da daptomicina na formulação injetável

#### 4.4 Referências

CLAS, S.D. et al. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical Science Technology Today**, v. 2 (8), p. 311-320, 1999.

FB 5. **Farmacopéia Brasileira, 5ª edição**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. Vol. 1, 2010.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n°. 4, p.670-673, 2004.

MARTENS-LOBENHOFFER, J. et. al. Validated high performance liquid chromatography-UV detection method for the determination of daptomycin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v.875, 546-550, 2008.

MOTHÉ, C.G.; AZEVEDO, A.D. *Análise térmica de materiais*. São Paulo: Editora, 2002.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7ªed. Rio de Janeiro, LTC, 2005.

SKOOG, HOLLER, NIEMAN; *Principios de Análisis Instrumental* , 5ª edicion, 2001,

---

**5. CAPÍTULO II – Development and validation of a stability-indication LC-UV method for determination of daptomycin injectable form and kinetic study in alkaline medium**

---



**5. CAPÍTULO II ARTIGO I - Development and validation of a stability-indication LC-UV method for determination of daptomycin injectable form and kinetic study in alkaline medium**

Publicação científica submetida ao periódico Analytical Methods

**Development and validation of a stability-indication LC-UV method for determination of daptomycin injectable form and kinetic study in alkaline medium**

Ana Paula Christ<sup>1</sup>, Mariana Souto Machado<sup>2</sup>, Priscila Rosa<sup>1</sup>, Clarice Madalena Bueno Rolim<sup>2</sup>,  
Andréa Adams<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Address correspondence to Prof. Dr. Andréa I. H. Adams. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Av Roraima, 1000. Santa Maria/RS - CEP 97105-900. Phone: +55 55 3220 8661. Fax: +55 55 3220 8248. E-mail: [andrea.i.h.adams@gmail.com](mailto:andrea.i.h.adams@gmail.com)

**Abstract:** An isocratic liquid chromatography method (LC-UV) was developed and validated for determination of daptomycin in injectable form. The method was carried out in a Waters XBridge C18 column (250 mm x 4.6 mm, 5 $\mu$ m). The mobile phase was composed of methanol/acetonitrile/buffer (pH 2.2) (40:30:30 v/v/v) at a flow rate of 1.0 mL<sup>-1</sup>, using photodiode array (PDA) detection at 223 nm. The retention time obtained to daptomycin was 6.1 min and the method was linear in the range of 10 to 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (r= 0.9999). Forced degradation studies were performed to verify the specificity and stability-indicating capability of the method. The degradation kinetics under alkaline conditions was also evaluated. The method showed suitable accuracy (99.17%) and precision (RSD 0.59%) A two level full factorial design was used to determine method robustness. The proposed method was applied for the analysis of daptomycin injectable form, contributing to improve the quality control of this pharmaceutical product.

**Keywords:** Daptomycin; HPLC; validation; full factorial design, stability-indicating, kinetic study.

## 1. Introduction

The resistance of gram-positive pathogens such as staphylococci, streptococci and enterococci has been reported in several countries (ENOCH, et al., 2007). Since 2002, the Infectious Diseases Society of America (IDSA) has voiced concern with the lack of progress in developing new antimicrobial agents to treatment of multi-resistant pathogens. In 2010 IDSA launched a campaign that aims to develop 10 new antibiotic safe and effective by 2020 (BOUCHER et al., 2013). Among the newly developed antibiotics are linezolid, quinupristin-dalfopristin, tigecycline, telavancin and deftarolime fosamil (ENOCH et al., 2007; BOUCHER et al., 2013).

Daptomycin (Figure 1) (Cubicin<sup>®</sup>, Cubist Pharmaceuticals Inc. and Novartis) is a new antibiotic, approved in 2003 by FDA. It is the first representing of a new antibiotic class named cyclic peptides and is marketed just as injectable pharmaceutical form (SAUERMAN et al., 2008). It was synthesized in 1980, produced from a strain of *Streptomyces roseosporus* and was originally named LY 146032 (ELIOPOULOS et al., 1986; DEBONO et al., 1987).

It has bactericidal activity in vitro against most gram-positive aerobic and anaerobic pathogens of clinical importance such *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant, *Streptococcus pyogenes* and *Enterococcus faecalis* but has no activity against gram-negative bacteria (ENOCH et al., 2007). Daptomycin mechanism is different from any other approved antibiotic since binds to the bacterial cell membrane causing its rapid depolarization due to potassium efflux which causes disruption of DNA, RNA and protein synthesis and fast bacterial dead. This antibiotic is highly calcium dependent; therefore, its activity is low in the absence of calcium (GIKAS et al., 2009; KOETH; THORNE, 2010). It is used for the treatment of several infections including vancomycin-resistant enterococcal infections, right-sided endocarditis with associated bacteremia, skin infections and other diseases caused by Gram-positive microorganisms (KOETH; THORNE, 2010; SADER et al., 2011).

Up to the present, there are no reported methods to determine daptomycin in pharmaceutical form. In the literature we found some HPLC methods aimed to determine daptomycin in biological fluids as serum (RYBAK et al., 1992; DERYKE et al., 2006; TOBIN et al., 2008), plasma (DVORCHIK et al., 2003; MARTENS-LOBENHOFFER et al., 2008; BAIETTO, et al., 2010; BAZOTI et al., 2011; VERDIER, et al., 2011) and blood (GIKAS et al., 2009; OLSZOWY et al., 2010). In 2010 Gika et al. (2010), developed a method to determine daptomycin in blood, urine and peritoneal fluid.



This paper describes the first method aimed to assay daptomycin injection. The method proposed was fully validated according ICH guidelines and it was also used to perform a degradation kinetic study of daptomycin in alkaline medium.

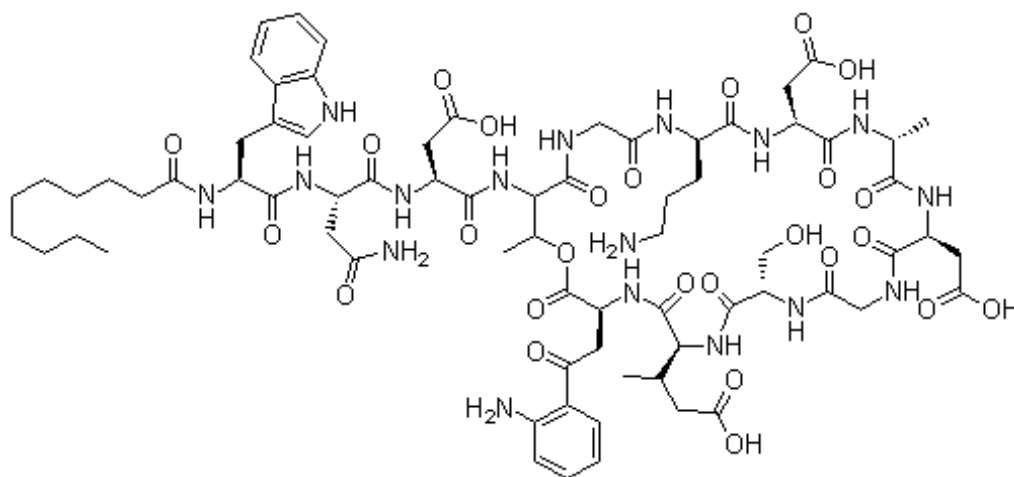


Figure 1 – Chemical structure of daptomycin

## 2. Experimental

### 2.1 Chemical and reagents

Daptomycin (DPT) reference substance was supplied by Hisun Pharmaceutical Co., Ltd. (Xukow Town, China). Daptomycin injection (Cubicin<sup>®</sup>, Novartis) was obtained at a local hospital, within its shelf life. HPLC-grade methanol and acetonitrile were obtained from Tedia (Farfield, Ohio, USA). All chemicals were of pharmaceutical or special analytic grade. Ultrapure water was purified by Mega Purity System<sup>®</sup>.

### 2.2 Instrumentation and analytical conditions

The method was developed in a Shimadzu LC System (Kyoto, Japan) equipped with a CBM-20A system controller, SPD-M20A PDA detector, DGU-20A5 degasser and LC-20AT pump. The column used to perform the analysis was Agilent XBridge C18 (250 mm x 4.6 mm) maintained at 20 to 22°C. The mobile phase was methanol, acetonitrile and buffer pH

2.2 (40:30:30 v/v/v). The mobile phase was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter (Milipore, Bedford, USA) and run at  $1.0\text{ mL min}^{-1}$ ; the detection was obtained at 223 nm. The peak area was integrated automatically by LC Solution Software Program and the quantitation was performed using the absolute peak area. The injection volume was 20  $\mu\text{L}$ .

### *2.3 Solutions preparation*

#### *2.3.1 Reference substance and sample solutions*

The stock solutions of reference substance and samples were prepared by dissolving the equivalent of 10 mg of DPT in volumetric flasks with deionized water, in order to obtain a concentration of  $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ . The solutions were stored at  $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$ , protected from light (maximum 7 days) and daily diluted to an appropriate concentration in mobile phase.

#### *2.3.2 Buffer pH 2.2*

The buffer was prepared by diluting 1.38 g of monobasic sodium phosphate in 1000 mL with deionized water and the pH was adjusted at 2.2 with phosphoric acid. The buffer was stored at  $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$  and used during 30 days.

### *2.4 Method validation*

The method was validated using samples of DPT injectable form according to ICH guideline (2005). The following parameters were evaluated: specificity, linearity, precision, accuracy and robustness.

#### *2.4.1 Specificity*

The ability to assess unequivocally the analyte in the presence of others components is known as specificity (ICH 2005). In order to verify this validation parameter, samples were

subjected to forced degradation. Also was established the quantitation and purity of the DPT peak after forced degradation in alkaline, acidic and oxidative media, high temperature and exposure do UVA radiation. Peak purity index above 0.999 was considered acceptable (WATSON, 2005). In all conditions was used stock sample solution described in section 2.3.1. Specific conditions are described below (n=3/condition).

#### *2.4.1.1 Alkaline and acidic hydrolysis*

To sample solution was added 5 mL of sodium hydroxide (NaOH) 0.01 M or 5 mL of hydrochloric acid (HCl) 0.1 M, to promote alkaline and acid hydrolysis, respectively. Alkaline solutions were maintained at room temperature during 30 minutes and neutralized with HCl 0.1 M. Acidic solutions were maintained at room temperature during 24 hours and neutralized with NaOH 1 M. The entire content was transferred to a 20 mL volumetric flask and volume was completed with mobile phase obtaining a concentration of 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### *2.4.1.2 Oxidative condition*

Five milliliters of hydrogen peroxide  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% was added to the sample solution and stored protected from light, at room temperature, for 10 hours. The entire content was diluted in a 20 mL volumetric flask and diluted with mobile phase obtaining a concentration of 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### *2.4.1.3 Photodegradation*

One milliliter of sample solution (25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) was exposed to UVA radiation (352 nm) for 12 hours in a covered transparent container in a light chamber. Containers with samples solutions protected from light were also placed in the chamber in order to verify any interference due to temperature rise. Immediately after exposure time, samples were analyzed.

#### 2.4.1.4 Thermal degradation

Sample solution at  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  was placed in a sealed glass bottle and placed in a dry oven at  $40^\circ\text{C}$  for 6 hours. After this period, aliquots of the solutions were analyzed.

#### 2.4.2 Linearity

The determination of method linearity was evaluated through the construction of three analytical curves, each one with five concentrations of DPT in the range of 10 to  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  (10, 20, 30, 40 and  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). To perform statistical evaluation analysis of variance (ANOVA) was used.

#### 2.4.3 Precision

The determination of precision was assessed by repeatability (intra-day) and intermediate precision, expressed as relative standard deviation (RSD). The intra-day precision was performed by determination of six samples on the same day prepared by the same analyst. Intermediate precision was verified by analyzing of six samples solutions prepared independently, changing day and analyst. All sample solutions were prepared as described in section 2.3.1, at  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 2.4.4 Accuracy

The accuracy was determined by adding known amounts of DPT reference substance at samples at the beginning of the process in three levels (70, 100 and 130% of work concentration). To obtain these solutions, amounts of 2 mL of sample solution ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were placed in 20 mL volumetric flasks where 1.5, 3.0 and 4.5 mL of reference sample ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were added. Dilutions were made in mobile phase to achieve final concentrations of 17.5, 25.0 and  $32.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectively. This procedure was realized in triplicate. Solutions of sample ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and reference substance ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were also prepared and analyzed.

#### 2.4.5 Robustness

The robustness evaluates potential sources of variation in one or more responses of the method. Factors that should be considered are related to the analytical procedure and environmental conditions. May be qualitative, quantitative or a mixture of both. Some of the factors that can be investigated for an HPLC method include pH of mobile phase, flow rate, column temperature, amount of the organic modifier, column manufacturer, wavelength and others (HEYDEN et al., 2001). In order to assess the robustness of the proposed method, a full factorial design ( $2^3$ ) with two levels (low and high) and three factors was carried out. From these experiments three relevant factors were chosen and investigated: percentage of methanol in mobile phase, flow and pH of mobile phase, named x1, x2 and x3, respectively (Table 1). A sample solution at  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  was used to measure the effect of factors and the selected experiments were performed randomly as shown in Table 3.

Table 1 – Factors and levels investigated in full factorial design

Factor	Level		
	-1	0	1
x1: methanol concentration (%)	36	40	44
x2: flow	0.9	1.0	1.1
x3: pH	1.9	2.2	2.5

#### 2.4.6 Stability standard solution

To determine the stability of daptomycin standard solution, the stock solution tested was maintained at 2-8°C for 7 days. During this period aliquots of this solution were diluted to the work concentration and analyzed, in order to evaluate changes in amount when compared with freshly prepared solutions.

#### 2.4.7 System suitability

System suitability test was determined to confirm that the equipment was suitable for the analyses to be performed. In order to verify it, chromatographic parameters and RSD values obtained from the injection of six replicates of the reference solution  $25\mu\text{g mL}^{-1}$  were determined.

#### 2.5 Kinetic studies

To determine the degradation kinetics in alkaline medium, portions of 5 mL of  $100\mu\text{g mL}^{-1}$  daptomycin were added to 5 mL of 0.01 M sodium hydroxide solution. At times 0, 10, 30, 60, 90, 120 and 180 minutes, the solutions were neutralized with 0.1 M hydrochloric acid and the volume was made up to 20 mL with mobile phase.

Degradation kinetics was determined by the decrease in drug concentration over time, calculated by the graphic method. Graphics of zero order, first order and second order were drawn by plotting drug residual content *versus* time,  $\ln$  of drug residual content *versus* time and  $1/\text{drug residual content}$  *versus* time, respectively. The correlation coefficient was calculated and the best fit was considered to establish the kinetic order (SILAMBARASAN; ABRAHAM 2013). The half-life ( $t_{1/2}$ ) was determined from the k-value, being  $t_{1/2} = \ln 2/k$ . The  $t_{90}$  (time for 10% decomposition) were obtained by equation inherent to the reaction order. The kinetic degradation was evaluated in triplicate at each time.

#### 2.6 Statistical software

General data was evaluated by ANOVA at 5% of significance level. The statistical analyses of robustness were performed by Minitab<sup>®</sup> v. 15 software (Minitab Inc., State College, PA, USA).

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Method optimization

In order to develop a method that would meet the recommended analytical parameters with a suitable retention time, several preliminary tests were performed. Due to the presence of two distinct pka's in molecule, 4.0 and 10.0, acidic and alkaline respectively (Sci Finder<sup>®</sup> 2012), we decided to work with low pH values, to prevent ionization of acid groups of molecule. About the organic components, daptomycin was detected after two hours without using acetonitrile in the mobile phase; thus, it was included on its composition, which resulted in shorter analysis time. As aqueous phase, we used at first a solution of 0.1% formic acid (pH 2.7), employed in several methods used to determine daptomycin in biological fluids (GIKA et al., 2010; BAIETTO et al. 2010; VERDIER 2011). However, the combination of formic acid, acetonitrile and methanol did not allowed a good separation of daptomycin and its degradation products. Changing formic acid by phosphate buffer pH 2.2, specificity and suitable peak symmetry were obtained. Detection wavelength was determined by an UV-scan of a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  daptomycin reference substance solution. To avoid the accumulation of substances strongly retained on the column it was washed with acetonitrile after about ten injections of the sample or standard solution (MARTES-LOBENHOFFER et al. 2008).

Thus, assay of daptomycin was obtained with the following conditions: acetonitrile, methanol and phosphate buffer pH 2.2 (30:40:30 v/v/v), flow rate of 1.0  $\text{mL min}^{-1}$ , detection at 223 nm, column Waters XBridge C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ) maintained at 20 to 22°C. With these conditions, the retention time of DPT 6.1 minutes and suitable values of resolution, tailing factor and theoretical plates were obtained. A typical chromatogram obtaining by this method is shown in Figure 2.

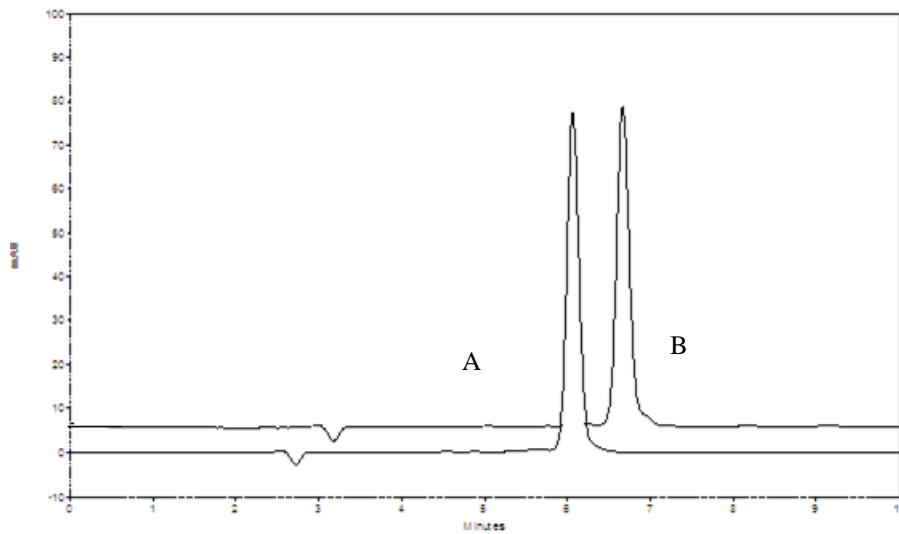
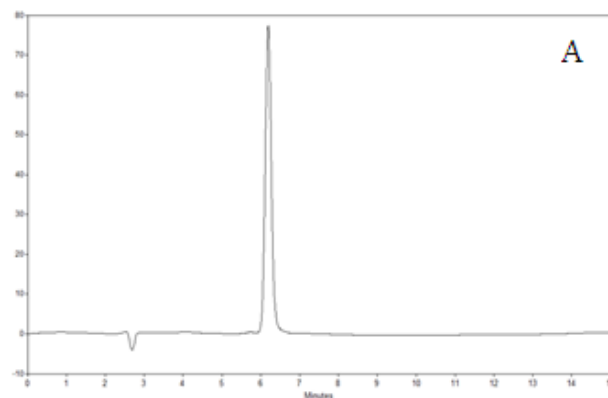


Figure 2 – Chromatograms of daptomycin SQR (A) and daptomycin injection (B)

### 3.2 Method validation

#### 3.2.1 Specificity

Since a proactive approach to developing a stability indicative HPLC method should involve forced degradation at the early stages of development (ALSANTE et al., 2007), we started the validation procedures by stress testing. DPT was not degraded in acid medium or by thermal degradation in conditions tested, being the residual content near 100% after reaction. After 12 hours of UVA radiation exposure content of DPT was near 46% (Figure 3-B). The drug was degraded in oxidative and alkaline media, being the residual content around 74% and 85% in these conditions, respectively (Figure 3-C and 3-D).





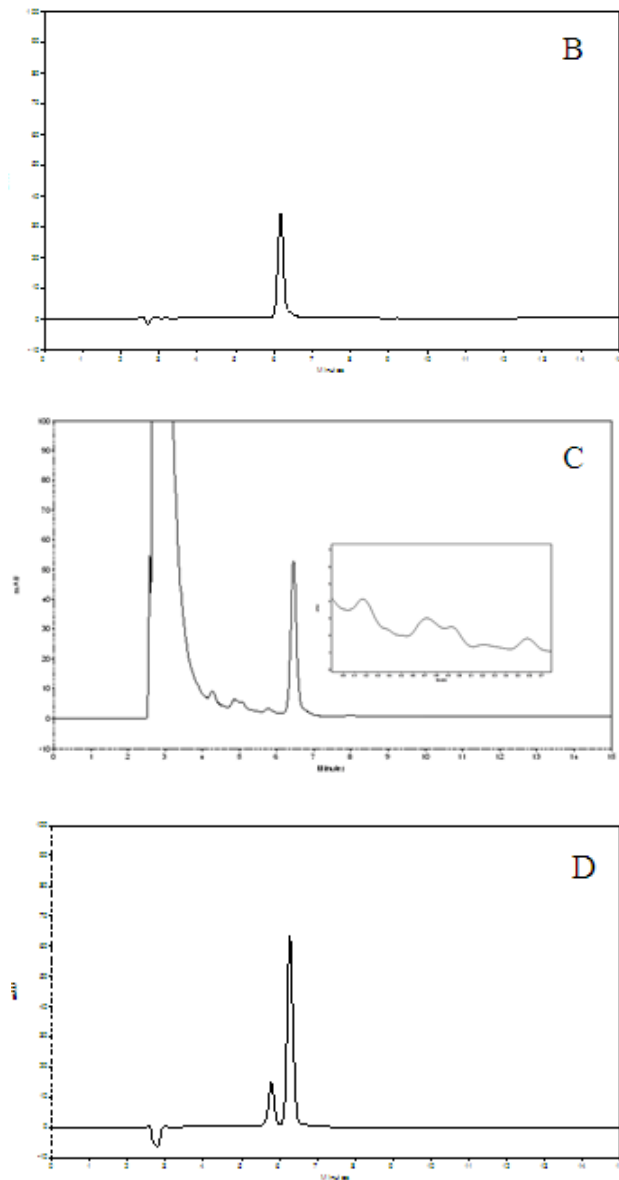


Figure 3 – LC chromatograms of daptomycin ( $25\mu\text{g mL}^{-1}$ ). (A) reference substance of daptomycin; (B) UVA radiation; (C) oxidative medium and (D) alkaline medium

From these experiments, extra peaks were observed in chromatograms, probably from degradations products, but in alkaline conditions their presence is more evident. Muangsiri and Kirsch (2001) reported the degradation pathway of daptomycin in alkaline conditions and suggested that degradation occurred or by hydrolytic cleavage of the ester bond between the C-terminal amino acid residue and the threonine side chain of the fourth amino acid residue or by the hydrolytic cleavage of an amide bond. PDA detector was used to determine the peak purity index. In all conditions, the values were higher than 0.999, which confirms the method specificity.

### 3.2.2 Linearity

The analytical curve for daptomycin was considered linear in the range of 10-50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  with a correlation coefficient of 0.9999 and linear equation  $y=34987x - 4590.7$ , where  $x$  is the concentration and  $y$  was the absolute peak area (mAU). The validity was checked by ANOVA, which indicated linear regression ( $p < 0.05$ ) and no significant deviation from linearity ( $p > 0.05$ ).

### 3.2.3 Precision

The method precision was evaluated by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) and was expressed as relative standard deviation (RSD). The intra-day RSD values were 0.69% (mean assay 100.17%,  $n=6$ , analyst 1, day 1) and 0.53% (mean assay 100.29%,  $n=6$ , analyst 2, day 2). The inter-day RSD value was 0.59% (mean assay 100.23%,  $n=12$ ). The RSD results are in agreement with recommended value, indicating precision of the method proposed (BAKSHI; SINGH, 2002).

### 3.2.4 Accuracy

The accuracy was verified by recovery test, through three determinations of three independent samples solutions containing DPT at three different levels, around the usual concentration of the method. The mean recovery obtained was 99.17%, with RSD 1.25%. The results are shown in Table 2 and indicate the accuracy of the method proposed.

Table 2 - Results of daptomycin reference standard recovery at the injectable daptomycin samples

Level (%)	Concentration added ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentration recovered ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recovery (%)	Mean (%)	RSD (%)
70	7.5	7.593	101.24	100.14	1.01
		7.443	99.24		
		7.495	99.94		
		15.051	100.34		
100	15.0	14.726	98.17	99.27	1.09
		14.894	99.29		
		22.310	99.11		
130	22.5	21.951	97.55	98.09	0.89
		21.966	97.63		
<b>Mean and RSD (full assay)</b>				99.17	1.25

(R1, R2 and R3): Samples added reference standard.

### 3.2.5 Robustness

The robustness can be described as the capacity of reproduce the analytical method in different circumstances without the occurrence of unexpected differences in the obtained results (HEYDEN at al., 2001). The importance of using a factorial analysis of the method robustness is the possibility to evaluate the influence of all experimental variables of interest and the interaction effects on the analytical responses (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). By robustness evaluation it is possible to determine which sources of variation must be more tightly controlled during the execution of the method.

We conducted  $2^3$  full factorial design and in this design can be determined interaction effects of second and third order. The three factors chosen to evaluate robustness method were methanol concentration (x1), flow (x2) and pH mobile phase (x3); interactions of second order can be evaluated by x1x2, x1x3, x2x3 and x1x2x3 represent third order interaction. Was evaluated the effect of method modification on three analytical responses: peak asymmetry, theoretical plates and assay. The results are shown in Table 4.

Table 3 – Full factorial design of three factors with optimized conditions points and respective responses

Sample	Random order	Factors			Responses		
		x1	x2	x3	Peak symmetry	Theoretical plates	Assay (%)
1	10	1	-1	-1	1.06	8684.80	99.35
2	5	-1	1	1	1.14	7163.23	101.11
3	11	1	1	-1	1.18	7240.40	101.34
4	6	-1	-1	-1	1.14	8343.05	100.18
5	4	-1	-1	1	1.05	8689.23	101.45
6	9	1	1	1	1.08	7516.61	99.52
7	7	-1	1	-1	1.19	7102.64	99.54
8	8	1	-1	1	1.05	8733.75	101.69
9	1	0	0	0	1.12	7806.95	100.36
10	2	0	0	0	1.13	7822.83	101.24
11	3	0	0	0	1.12	7848.96	100.65

x1: percentage of methanol in mobile phase; x2: flow; x3: pH of mobile phase.

The significance of the effects was evaluated by a Pareto chart of the standardized effects. Pareto graph (Figure 4) consists of bars, which length is proportional to the absolute value of the estimated effect divided by the pseudo standard error. The codes A, B and C correspond to the analytical factors evaluated. When an interaction between two factors occurs, this is indicated by a bar with their combination. The chart includes a vertical line at the critical  $t$ -value for  $\alpha$  of 0.05. Effects that cross the line are considered significant for the factor or factors combination analyzed. From this result, it was concluded that no single factor or their combination (second or third order) produced responses outside acceptable limits for the method, which indicated the method is robust for the determination of DPT in injectable form.

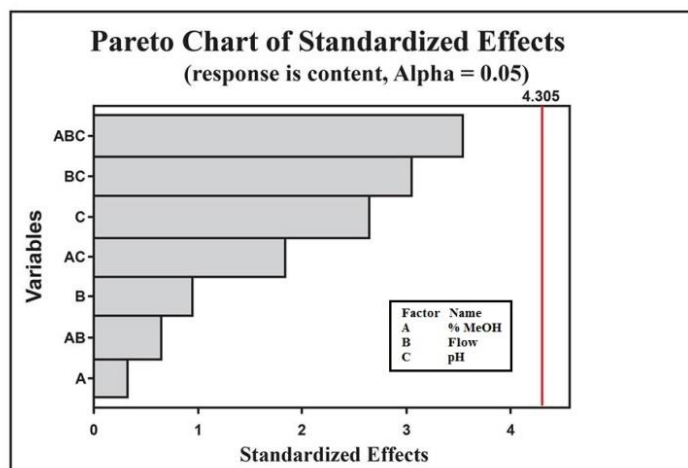


Figure 4 – Pareto chart of the standardized effects

### 3.2.6 Stability of standard solution

The stability of standard solution was evaluated by comparing the results of the standard solution stored at 2-8°C with those obtained for the standard prepared on the same day. The RSD values during the 7 days were < 2.0%, being the DPT assay 98.7%, at the day 7.

### 3.2.7 System suitability

The system suitability was evaluated by six replicate injections of DPT reference solution (25 µg mL<sup>-1</sup>). The chromatographic parameters obtained were: theoretical plates, 7801 (RSD 1.36%); tailing factor, 1.19 (RSD 1.81%); capacity factor, 5.06 (RSD 0.55%). The RSD values between areas of six injections and the retention time were 1.12% and 0.41%, respectively. All these values were in accordance with the recommended ones (CDER 1994).

### 3.3 Kinetic studies

Zero order, first order and second order models were used for modeling the kinetics of daptomycin degradation. The correlation coefficient was calculated and the best correlation coefficient was considered to establish the kinetic order. The degradation of DPT follows first

order kinetic, since there is a linear relationship between the inverse of the residual concentration versus time ( $r = 0.9953$ ) (SILAMBARASAN; ABRAHAM, 2013). The value obtained from rate constant ( $k$ ) was  $0.0047 \text{ min}^{-1}$  by the graphic equation.

The time obtained through equation  $t_{90\%} = 0.106/k$  is 22.55 minutes, very close from the value obtained experimentally (16% of degradation in 30 minutes). The time required for DPT to be reduced to half the original value (half-life) was evaluated by  $t_{1/2} = 2,303/k \log C_0/C$  equation and time obtained was 130.81 minutes, in the conditions adopted.

#### 4. Conclusion

The method proposed proved to be simple, linear, precise, accurate, specific and robust in range from 10 to  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , meeting the ICH requirements. Considering the results, the method can be applied to the routine quality control of injectable form and in stability studies; also, it represents a contribution to improve the quality of this pharmaceutical product.

#### 5. Acknowledgements

The authors wish to thank CAPES (Brazil) for financial support, to Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) for providing the samples and Cristalia (Brazil) for providing the reference substance.

#### 6. References

- ALSANTE, K.M.et al. The role of degradant profiling in pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced drug delivery reviews**, v.59, p.29-37, 2007.
- BAIETTO, L.et al. 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.
- BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods – critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BAZOTI, F.N. et al.. 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, 78-85, 2011.

BOUCHER, H.W. et al.. 10 X '20 Progress – Development of new drugs active against gram-negative bacilli: An update from the infectious diseases society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 56, n.12, p.1685-1694, 2013.

CDER – Center for drug evaluation and Research. **Validation of Chromatographic Methods**, 1994.

DEBONO, M. et al. A21978C, a complex of new acidic peptide antibiotics: Isolation, chemistry, and mass spectral structure elucidation. **The Journal of Antibiotics**, v.40, n.6, p. 761-777, 1987.

DERYKE, C.A. et al. Serum bactericidal activities of high-dose daptomycin with and without co administration of gentamycin against isolates of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.11, p.3529-3534, 2006.

DVORCHIK, B.H. et al. Daptomycin pharmacokinetics and safety following administration of escalating doses once daily to healthy subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p.13-18, 2003.

ELIOPOULOS, G.M. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of LY146032, a new cyclic lipopeptide antibiotic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n. 4, p.53-535, 1986.

ENOCH, D.A. et al. Daptomycin. **British Infection Society**, v. 55, 205-213, 2007.

GIKA, H.G. et al. 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. et al.. Development and validation of a UPLC-UV method for the determination of daptomycin in rabbit plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 24, p. 522-527, 2009.

HEYDEN, Y.V. et al. Guidance for robustness/ruggedness test in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, 723-753, 2001.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q2R1: **Guideline on Validation of Analytical Procedure – Methodology**, 2005.

KOETH, L.M.; THORNE, G.M. Daptomycin in vitro susceptibility methodology: a review of methods, including determination of calcium in testing media. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 32, n. 21, p. 161-169, 2010.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, cap.26. p.1279-1293, 2001

MARTENS-LOBENHOFFER, J. et al. Validated high performance liquid chromatography-UV detection method for the determination of daptomycin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v.875, 546-550, 2008.

MUANGSIRI, W.; KIRSCH, L. The kinetics of the alkaline degradation of daptomycin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, 1066-1075, 2001.

OLSZOWY, P. et al. New coated SPME fibers for extraction and fast HPLC determination of selected drugs in human blood. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 53, 1022-1027, 2010.

RYBAK, M.J. et al. Pharmacokinetics and bactericidal rates of daptomycin and vancomycin in intravenous drug abusers being treated for Gram-positive endocarditis and bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n.5, p. 1109-1114, 1992.

SADER, H.S. et al. Antimicrobial susceptibility of daptomycin and comparator agents tested against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci: trend analysis of a 6-year period in US medical centers (2005-2010).

SAUERMAN, R. et al. Daptomycin: A review 4 years after first approval. **Pharmacology**, v. 81, p.79-91, 2008.

SCIFINDER SCHOLAR. American Chemical Society (ACS), 2012.

SILAMBARASAN, S.; ABRAHAM, J. Kinetic studies on enhancement of degradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP by a newly isolated *Alcaligenes* sp. JAS1. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.44 p.438-445, 2013

TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova** v. 29, no 2, 338-350, 2006.

TOBIN, C.M. et al. An HPLC assay for daptomycin in serum. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.1462-1476, 2008.

VERDIER, M.C. et al. 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.

WATSON, D. G. Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.



---

**6. CAPÍTULO III – Development and validation of stability-indicative turbidimetric assay to determine the potency of daptomycin in injectable form in presence of degradation products**

---



**6. CAPÍTULO III ARTIGO II - Development and validation of stability-indicative turbidimetric assay to determine the potency of daptomycin in injectable form in presence of degradation products**

Publicação científica submetida ao periódico Talanta

**Development and validation of stability-indicative turbidimetric assay to determine the potency of daptomycin in injectable form in presence of degradation products**

Ana Paula Christ<sup>1</sup>, Mariana S. Machado<sup>2</sup>, Karla G. Ribas<sup>2</sup>, Cristiane de Bona da Silva<sup>2</sup>,  
Andréa I.H. Adams<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Address correspondence to Prof. Dr. Andréa I. H. Adams. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Av Roraima, 1000. Santa Maria/RS - CEP 97105-900. Phone: +55 55 3220 8661. Fax: +55 55 3220 8248. E-mail: [andrea.ih.adams@gmail.com](mailto:andrea.ih.adams@gmail.com)

**Abstract:** Daptomycin is the first representing of the class of cyclic lipopeptide available for commercialization and is active against gram-positive bacteria, including resistant strains. The aim of this work was to develop and to validate a turbidimetric microbiologic assay to daptomycin determination in injectable form. A 3x3 design was employed, the microorganism test used was *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p and Antibiotic Medium 3 was used as culture medium. Validation of the method demonstrated that the bioassay was linear ( $r=0.9995$ ), precise ( $RSD = 2.55\%$ ), accurate ( $100.48 \pm 2.109\%$ ) and robust. The degradation kinetics in alkaline medium was also performed and indicated that daptomycin degradation follows first order in this condition. Analyses of degraded solutions showed that daptomycin degradation products do not possess bactericidal activity. The bioassay was compared with HPLC method previously developed and there was no significant difference between both ( $p>0.05$ ). The method proved to be appropriate for daptomycin injection quality control.

**Keywords:** microbiologic assay, turbidimetric assay, validation, daptomycin, quality control, agar diffusion assay

## 1. Introduction

When the first antibiotics such as penicillin began to be used in clinical medicine, around 1940, they were considered wonderful drugs, since they were able to treat serious infectious diseases, such as pneumonia and tuberculosis. (FERNANDES, 2006; EOM et al., 2013), However, the widespread use of antimicrobials created a constant selective pressure that resulted in the survival and spread of resistant bacteria. The resistance of microorganisms to antimicrobial agents has been reported for several pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Enterobacter* species, among others (SPELLBERG et al., 2008; BOUCHER et al., 2013).

Over the past decade some new antibiotics have been approved including linezolid approved in the USA in 2000 and EU in 2001, tigecycline approved in the USA in 2005 and EU in 2006, daptomycin approved in USA in 2003 and EU 2006 and telavancin, which was approved in USA in 2009 (SAKOULAS 2009; BOUCHER et al., 2013).

The focus of this study is daptomycin (Figure 1), a cyclic lipopeptide with activity limited to gram-positive bacterial such *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus pneumoniae* including multidrug-resistant and susceptible strains (STEENBERGEN et al., 2005; KOETH & THORNE 2010; LU et al., 2011). The molecule is obtained of a strain of *Streptomyces roseosporus* and is originally known as LY 146032 (ELIOPOULOS et al., 1986; DEBONO et al., 1987). The mechanism of action is physiologic calcium dependent and possibly involves the disrupting of amino acid transport by the cell membrane and changes in the cytoplasmic membrane potential (DEBONO et al., 1987; KOETH & THORNE 2010; LU et al., 2011).

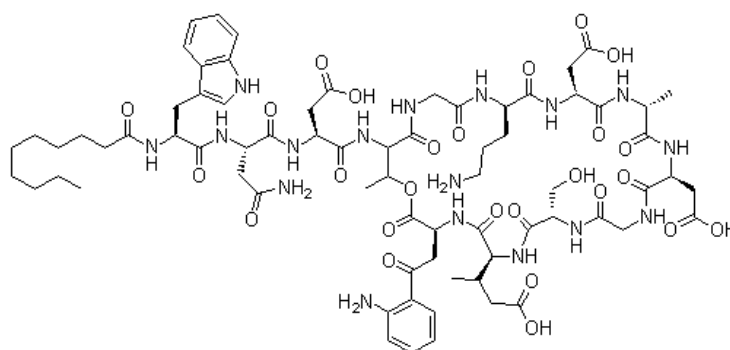


Figure 1- Chemical structure of daptomycin

There are some LC methods reported in literature to determine daptomycin in some biological fluids such serum (RYBAK et al., 1992; DERYKE et al., 2006; TOBIN et al., 2008), blood (GIKAS et al., 2009; OLSZOWY et al., 2001) and plasma (DVORCHIK et al., 2003; MARTENS-LOBENHOFFER et al., 2008; BAIETTO, et al. 2010; VERDIER et al., 2011) but there is no reports about methods focused in the assay of daptomycin injection, the only pharmaceutical form available.

Because of the increasing of pathogens resistance and difficulty in developing new antimicrobial drugs, it is relevant to ensure the quality of those available on the market. The absence of methodologies to determine daptomycin in pharmaceutical form encouraged the development of this study.

Two methods are commonly used to assay antibiotics in pharmaceuticals: agar diffusion and broth turbidity (turbidimetric assay). Both permit an estimate of antibiotic potency through direct comparison of a test antibiotic with a reference substance. By these assays, it is possible to perceive reduction in antimicrobial activity caused by subtle changes, not demonstrable by chemical methods. Thereafter, microbial or biological assays remain generally the standard for resolving doubt with respect to possible loss of activity (USP, 2013).

The aim of this study was to develop and validate a simple, specific, accurate, reproducible and stability-indicative turbidimetric microbiological assay to quantify daptomycin injectable. Moreover, a high performance liquid chromatographic (HPLC) method, developed and validated in our laboratory, was chosen as a comparison method to determine daptomycin in degraded samples.

## **2. Experimental**

### *2.1 Chemical and reagents*

Daptomycin (DPT) reference substance was supplied by Hisun Pharmaceutical Hangzhou, Co., Ltd. (Xukow Town, China) and used as purchased. Commercial samples of DPT (Cubicin<sup>®</sup>, Novartis, São Paulo, Brazil) were kindly provided by Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) within their shelf life. Antibiotic Medium 1 and Antibiotic Medium 2 were obtained from Himedia (Brazil) and Antibiotic Medium 3 was obtained from Difco

(Brazil). All chemicals were of pharmaceutical or special analytic grade. For all analyses ultrapure water was purified using a Millipore MilliQ<sup>®</sup> A 10 water system (Billerica, USA).

## 2.2 Preparation of reference substance and sample solutions

Both the stock solutions (reference substance and sample) were prepared by dissolving the equivalent of 10 mg of DPT and diluting with ultrapure water, in order to obtain 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  solutions. To conduct the microbiological assay the stock solution was prepared in the day of the assay and diluted with the same solvent to concentrations of 1, 2 and 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 2.3 Preparation of calcium stock solution

Stock solution of calcium was prepared diluting 3.67g of calcium chloride dihydrate in a volumetric flask of 100 mL with ultrapure water, obtaining a concentration of 36.7  $\text{mg mL}^{-1}$  (equivalent to 10  $\text{mg mL}^{-1}$  of calcium). This solution was sterilized, stored at 2-8°C and added to culture medium after sterilization process.

## 2.4 Microorganism and inoculum standardization

The microorganism used in this assay was *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p. The microorganism was stored at 2-8°C, in Antibiotic Medium No. 1 agar. Twenty four hours before the assay it was pealed to another test tube with the same agar and incubated at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . The bacteria was suspended and diluted in saline in order to obtain a suitable suspension with  $25\% \pm 2$  transmittance in 580 nm, using a suitable spectrophotometer and saline as blank. This microorganism suspension was stored at 2-8°C and was used along 7 days. For the turbidimetric bioassay, 1 mL of this suspension was added to sterilized 100 mL Antibiotic Medium 3, which was previously sterilized.



### *2.5 Turbidimetric method*

For the development of the microbiological method a 3x3 design was chosen. On this model, three solutions of standard and sample in the same presumed concentration are compared in order to determine the antibiotic potency (USP 36). In test tubes, 9 mL of inoculated Antibiotic Medium 3 and 1 mL of sample or standard solution were mixed. Then, they were incubated at 37°C during 5 hours in a water bath with circulation. Concomitantly, negative test tubes (9 mL of Antibiotic Medium 3 and 1 mL of water) and positive test tubes (9 mL of inoculated Antibiotic Medium 3 and 1 mL of water) were incubated. All the test tubes were prepared in triplicate. After incubation, the absorbance of samples, reference substance and control test tubes was determined, at 530 nm.

### *2.6 Method validation*

The method was validated according to International Conference on Harmonization (ICH 2005) by determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy and robustness.

#### *2.6.1 Specificity*

The capacity of the method to determine DPT in presence of degradation products was evaluated by comparing results obtained from same sample degraded analyzed by HPLC method (previously validated by our research group) and microbiologic assay. To promote the drug degradation, 5 mL of DPT 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were mixed with 5 mL of sodium hydroxide 0.01M; after 30 minutes, the solution was neutralized with hydrochloric acid 0.1 M. After neutralization, 1 mL of samples was mixed with 9 mL of Antibiotic Medium 3 and incubated at 37°C during 5 hours in a water bath with circulation. After incubation, the absorbance of samples, reference substance and control test tubes was determined, at 530 nm. The analyses were accessed in duplicate.

### 2.6.2 Linearity

Three doses of reference substance solutions were used in six independent assays. The doses used were 1, 2 and 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and the linearity was evaluated by linear regression and linearity deviation.

### 2.6.3 Precision

The precision was determined by repeatability and intermediate precision and the results were expressed as the relative standard deviation (RSD). Repeatability was evaluated by assaying two DPT independent samples on same day and under same experimental conditions (intraday); intermediate precision was evaluated by assaying two independent samples by day, in six different days (inter-day).

### 2.6.4 Accuracy

Accuracy was determined by recovering of known quantities of reference substance added to the samples. The recovery was determined in three levels named R1, R2 and R3 (70, 100 and 130% of work concentration). Samples solutions of DPT and reference substance solutions were prepared according to item 2.2. Aliquots of 1 mL of sample solution and aliquots of 0.4, 1.0 and 1.6 mL of reference substance solution were mixed and diluted with ultrapure water at 100 mL obtaining final concentration of 1.4, 2.0 and 2.6  $\text{mL}^{-1}$  respectively. One milliliter of these final solutions was added to test tubes containing 9 mL culture medium. The tubes were incubated at 37°C during 5 hours in a water bath with circulation. After incubation, the absorbance of samples, reference substance and control test tubes was determined, at 530 nm. The percentage recovery of DPT was calculated

### 2.6.5 Robustness

The robustness was evaluated by analyzing the effect on assay values promoted by variations in two experimental factors: incubation time and calcium concentration. Both were

evaluated in the range of  $\pm 10\%$  around the optimized value. The assays were performed in duplicate.

### 2.7 Degradation kinetic in alkaline medium

DPT sample solution at  $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  was stored with sodium hydroxide  $0.01\text{M}$  during 0, 30, 60, 90 and 120 minutes. At the end of each exposure time, solutions were neutralized with hydrochloric acid and the concentration was adjusted to  $2.5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  with water, to perform the turbidimetric assay and to  $25\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  to HPLC assay. The assay was performed in duplicate.

The degradation kinetic of solutions was determined by plotting concentration *versus* time,  $\ln$  of concentration *versus* time and reciprocal of concentration *versus* time (zero-order, first-order and second-order process, respectively). The reaction order was indicated by the best fit to model, indicated by regression coefficient ( $r$ ). Parameters such as degradation rate constant ( $k$ ) and half-life (time to decrease the drug content to 50%) were calculated.

### 2.8 HPLC method

The chromatographic method was developed in a Shimadzu<sup>®</sup> liquid chromatograph with a Waters XBridge C18 column (250 mm x 4.6 mm,  $5\mu\text{m}$ ). The mobile phase was acetonitrile, methanol and phosphate buffer pH 2.2 (30:40:30 v/v) at a flow rate  $1\text{ mL min}^{-1}$  and isocratic elution. The run time was 10 min and the injection volume was  $20\text{ }\mu\text{L}$ . DPT was determined by UV detection at 223 nm using photodiode-array detector

### 2.9 Comparison of methods

In order to compare the results obtained by chromatographic method and microbiologic assay, the precision results of both methods were statistically analyzed using the Student's statistical  $t$  test, at a 5% significance level.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Preliminary studies

The potency of antibiotics in pharmaceuticals can be assessed by cylinder-plate assay (also known as agar diffusion assay) and the turbidimetric assay. Agar diffusion is usually the method of choice when the characteristics of antibiotic allow using it (particularly water-soluble compounds). Turbidimetric assay is used less widely than diffusion assay, although it might be considered to resemble more closely the clinical situation. It is more commonly used to assay antibiotics poorly soluble in water (BAIRD, HODGES, DENYER, 2000).

Our first attempts were aimed at developing agar diffusion method, considering the widespread usage of it and the aqueous solubility of DPT. We used the 3x3 design (three doses of reference and three doses of sample in each plate), in a bilayer system with six plates for each assay. The base layer consisted of 10 mL of Antibiotic Medium 2; as inoculated layer, it was used 5 mL of Antibiotic Medium 1 inoculated with *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p, at 0.5 %. This layer was supplemented with calcium ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) after sterilization. DPT solutions in the range of 1.5 to  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  were tested. As result, DPT concentrations of 8, 16 and  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  were chosen. The plates were prepared and 100  $\mu\text{L}$  of reference substance and sample solutions were poured into stainless steel cylinders, which were carefully disposed over the solidified media. The plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  during 18 hours and the inhibition zones formed by reference substance and sample solutions were compared.

The mean inhibition zones obtained for DPT reference substance were  $12.11 \text{ mm} \pm 3.23$ ,  $14.44 \text{ mm} \pm 1.79$  and  $16.26 \text{ mm} \pm 2.12$ , for 8, 16 and  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. The potency found in precision assays was  $94.14 \pm 1.42\%$  ( $n=12$ ). The representative linear equation for these assays was  $y = 6.8937x + 5.9466$  ( $r = 0.9975$ ) where  $x$  is log of concentration and  $y$  is inhibition zone (mm). The assays met the statistical requirements established in official compendia regarding precision and linearity results. However, the accuracy parameter was the limiting step to develop the agar diffusion assay. By the recovery test, it was indicated the inability of the method to detect changes in drug content. As example, the inhibition zones found to  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  was around 16.3 mm and to  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  was 17.3 mm. Similar responses are reported to other drugs with high molecular weight, as vancomycin, teicoplanin and polymyxins and are attributed to difficulties of them in to

diffuse in solid media (KOETH; THORNE, 2010). Facing to these results, we gave up of the agar diffusion assay and started to develop the turbidimetric assay.

### *3.2 Calcium concentration*

The effect of calcium in the mechanism of action of DPT was initially reported in 1986 (ELIOPOULUS, et al., 1986). A subsequent study demonstrated that DPT MICs are generally twofold to fourfold lower when tested in broth containing  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  of calcium (FUCHS et al., 2000). Another more recent study also confirms the results obtained in previous studies suggesting the important presence of calcium in susceptible assays using culture medium containing or supplemented with  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  of calcium (KOETH; THORNE 2010).

To verify necessity of calcium in the microbiological assay, tests with and without calcium were performed. In agar diffusion assay, calcium was added in culture medium after sterilization and in the turbidimetric assay calcium was added after sterilization to the broth. Three concentration of reference solution ( $8, 16$  and  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were used in agar diffusion assay and in turbidimetric assay ( $1, 2$  and  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). The mean of diameters zones without calcium were  $8.37, 9.36$  and  $10.23$  mm, respectively and  $13.05, 14.99$  and  $16.33$  with calcium. The absorbances found in assay with calcium were  $0.275, 0.167$  and  $0.067$  and without calcium were  $0.271, 0.287$  and  $0.289$ . These results demonstrated that in absence of calcium the antimicrobial activity was visible smaller than when used calcium at  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### *3.3 Turbidimetric assay*

After attempts with diffusion method attentions were focused on turbidimetric method. Several assays with different conditions were conducted to establish the optimal to develop the turbidimetric method (Table 1). Absorbance values in the range of  $0.1$  to  $0.5$  was considered as indicative of the suitability of conditions employed (BAIRD, HODGES, DENYER, 2000). The best results were found with the following conditions: Antibiotic Medium 3 supplemented with calcium, inoculum concentration of  $1.0\%$ ,  $5$  hours of incubation, concentrations of reference substance and sample solutions at  $1.0, 2.0$  and  $4.0 \mu\text{g}$

mL<sup>-1</sup>. To obtain the supplemented media, 0.5 mL of calcium solution (prepared as cited in 2.3) was added to 100 mL of Antibiotic Medium 3 after sterilization.

Table 1- Conditions tested to establish the turbidimetric assay conditions

<b>Parameters</b>	<b>Conditions</b>
Standard curve points (µg/mL)	0.1, 0.25 and 0.5; 0.5, 1.0 and 2.0; 1.0, 2.0 and 4
Culture medium	Casoy Broth; Antibiotic Medium 3
Inoculum concentration (%)	0.2; 0.4; 0.5; 0.8 and 1.0
Incubation time (hours)	3.0; 4.0 and 5.0

The test tubes were randomly distributed in the water bath and were observed the same interval of time for loading and unloading all of them. After incubation microorganism growth was stopped by adding 0.5 mL of formaldehyde 12%. The results were known after analysis of samples in a spectrophotometer at 530 nm and the amount was accessed by comparing of sample and reference substance absorbances.

### 3.4 Specificity

According literature (ALSANTE et al., 2007), degradation in the range of 5-20% is sufficient to verify that there is no interference of degradation products in the tests performed in acidic or basic conditions. Preliminary tests indicated high degradation rate in alkaline medium. Thus, we employed 0.01M NaOH, at room temperature. Samples were assayed by the turbidimetric and HPLC methods and similar results were found, respectively 86.9% (n= 2 RSD, 3.16 %) and 82.4% (n= 3 RSD, 1.78 %). These results confirmed the stability indicative characteristic of the assay, since it showed the sample potency against a microorganism, in the presence of degradation products.

### 3.5 Linearity

The calculation procedure usually assumes a direct relationship between the absorbance and the logarithm of respective dose. The corresponding mean absorbance for

reference substance solutions were: 0.3035 for the lower dose ( $1\mu\text{g mL}^{-1}$ ), 0.1995 for the intermediate dose ( $2\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and 0.1058 for the higher dose ( $4\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The calibration curves for DPT were constructed by plotting log concentrations ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) versus absorbance and showed good linearity between the range of 1 and  $4\mu\text{g mL}^{-1}$ . The representative linear equation for this assay was  $y = -0.3284x + 0.3018$ , with a suitable coefficient of regression ( $r = 0.9995$ ). The assay showed significant regression ( $p < 0.05$ ) and no deviation from linearity ( $p > 0.05$ ).

### 3.6 Precision

The experimental values obtained in the assay of DPT injection are shown in Table 2. The precision of the assay was evaluated in two levels: repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) and the results are expressed as the RSD of the measurement series. The repeatability was assessed by samples determinations in same day and same experimental conditions. The intermediate precision was determined by same conditions but different days. In both, the RSD values are close than 2.0%.

Table 2- Precision data of turbidimetric assay to determination of DPT in injection

Sample	Potency					
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
1	100.88	98.15	97.22	102.64	104.31	102.02
2	100.22	99.18	97.72	104.38	104.11	100.65
<b>Mean intra-day</b>	100.55	98.67	97.47	103.51	104.21	101.34
<b>RSD Intra-day</b>	0.46	0.74	0.36	1.19	0.14	0.96
<b>Mean inter-day</b>	100.96					
<b>RSD inter-day</b>	2.58					

### 3.7 Accuracy

Recovery of DPT was accessed by the determination of the analyte in solutions prepared by the standard addition method. The results (Table 3) were acceptable to this method.

Table 3- Accuracy of turbidimetric assay to determination of DPT injection

Sample*	Reference substance added ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentration recovered ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)	Mean (%)	RSD (%)
<b>R1</b>	0.4	0.3849	96.23	98.51	2.29
		0.3942	100.75		
		0.4025	98.55		
<b>R2</b>	1.0	1.0085	100.85	101.40	0.50
		1.0152	101.84		
		1.0184	101.52		
<b>R3</b>	1.6	1.5927	99.54	102.29	0.80
		1.6517	101.82		
		1.6294	103.23		
			<b>Mean recovery(%)</b>	<b>100.48</b>	
			<b>RSD</b>	<b>2.09</b>	

### 3.8 Robustness

The results of robustness evaluation are showed Table 4. The results obtained indicated that the modifications in method parameters do not caused significantly differences in DPT assay ( $p>0.05$ ).



Table 4 – Robustness determination of DPT turbidimetric assay

<b>Daptomycin assay (% of theoretical value)</b>					
	Optimized condition*	Calcium concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Incubation time (h)	
		55	45	4.5	5.5
Sample 1	99.11	99.37	100.55	99.94	99.79
Sample 2	100.44	99.89	101.13	100.40	99.19

\* calcium concentration at  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , incubation time 5 hours.

### 3.9 Kinetic degradation

A linear relationship between the  $\ln$  of remaining concentrations *versus* time was observed. This indicated that the reaction of DPT degradation in the condition evaluated followed first-order kinetic and that degradation rate depends on the reagent concentration. First-order kinetics was calculated from the first-order rate equation:  $k=1/t \ln C_0/C$  where  $C_0$  is the initial concentration,  $C$  is de concentration in any time ( $t$ ) and  $k$  is the rate constant (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001). From this equation the result found was  $k=0.0055$ .

Through the data obtained it was also possible to determine the half-life and  $t_{90\%}$  of daptomycin in the degradation employed condition. The obtained value was 128.37 and 19.36 minutes, respectively, consistent with experimental values (degradation of 43.5% in 120 minutes). Analyzing the results obtained by the two methods it can be seen that both give a similar percentage remaining of DPT (Figure 2).

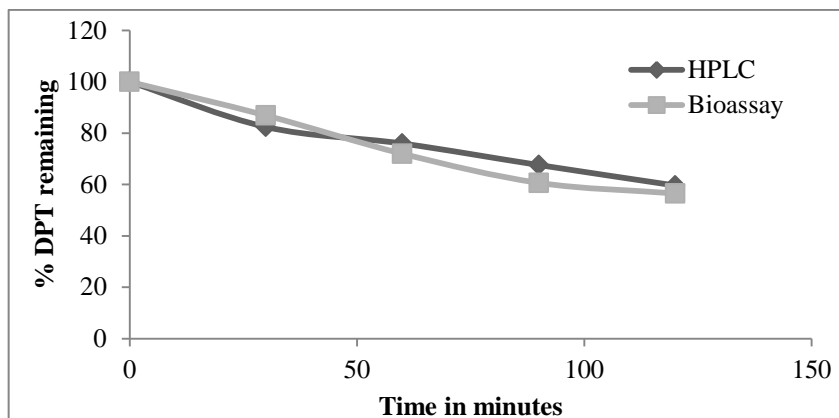


Figure 2 – DPT assay after alkaline degradation at 0, 30, 60, 90 and 120 minutes of exposure, by turbidimetric bioassay and chromatographic methods

### 3.10 Comparison of methods

The results obtained in turbidimetric bioassay were compared with those obtained in HPLC method. By microbiological assay the mean potency ( $\pm$  RSD%) found was  $100.96 \pm 2.58$  and by HPLC method was  $100.23 \pm 0.59$ . These results were statistically evaluated by analyses of variance which indicated no significant differences between both methods ( $p > 0.05$ ).

The quantification of antibiotic by chemical methods, such HPLC, although precise, cannot truly show biologic activity. Although the bioassays have a high variability, the RSD values obtained in precision evaluation are within the recommended ones. Moreover, potency results are within pharmacopeial potency limits of 90-110% applied to antimicrobial pharmaceutical preparations (USP 36). Biological methods have some advantages in comparison to methods such HPLC and UV spectrophotometric, as the low cost of equipment, the good relationship with clinical use and they can determine the content and also biological activity. Thus, this assay might be very useful to determination of DPT in pharmaceutical dosage forms.

## 4. Conclusions

The proposed turbidimetric bioassay demonstrated good linearity, precision, accuracy, robustness, specificity and stability-indication, being an acceptable method for routine quality control of daptomycin. Although agar diffusion assay is more used to quantify antimicrobials,

the turbidimetric assay is faster and the measure of the response is automated. The developed method meets all the requirements to be used in routine quality control of daptomycin injection.

## 5. Acknowledgements

The authors wish to thank CAPES (Brazil) for financial support, Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) for providing the samples and Cristalia (Brazil) for providing reference substance. We also thank Laboratório de Farmacotécnica (UFSM) for allowing analyzes were performed in this laboratory.

## 6. References

ALSANTE, K.M.et al.The role of degradant profiling in pharmaceutical ingredients and drug products.**Advanced drug delivery reviews**, v.59, p.29-37, 2007.

BAIETTO, L.et al .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.

BAIRD, R.M.; HODGES, N.A.; DENYER, S.P. Handbook of Microbiological Quality Control : CRC Press. p.190-204, 2000.

BOUCHER, H.W.et al. 10 X '20 Progress – Development of new drugs active against gram-negative bacilli: An update from the infectious diseases society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 56, n.12, p.1685-1694, 2013.

DEBONO, M.et al. A21978C, a complex of new acidic peptide antibiotics: Isolation, chemistry, and mass spectral structure elucidation. **The Journal of Antibiotics**, v.40, n.6, p. 761-777, 1987

DERYKE, C.A.et al. Serum bactericidal activities of high-dose daptomycin with and without co administration of gentamycin against isolates of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.11, p.3529-3534, 2006.

DVORCHIK, B.H.et al. Daptomycin pharmacokinetics and safety following administration of escalating doses once daily to healthy subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p.13-18, 2003.

ELIOPOULOS, G.M. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of LY146032, a new cyclic lipopeptide antibiotic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n. 4, p.53-535, 1986.

EOM, S.H.; KIM, Y.M.; KIM, S.K. Marine Bacteria: potential sources for compounds to overcome antibiotic resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p.4763-4773, 2013.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development – the failure of success? **Nature Biotechnology**, v.24, n. 12, p. 1497-1503, 2006.

FUCHS, P.C.; BARRY, A.L.; BROWN, S.D. Daptomycin susceptibility tests: interpretative criteria, quality control, and effect of calcium in vitro tests. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.38, p.51-58, 2000.

GIKAS, E. et al.. Development and validation of a UPLC-UV method for the determination of daptomycin in rabbit plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 24, p. 522-527, 2009.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q2R1: **Guideline on Validation of Analytical Procedure – Methodology**, 2005.

KOETH, L.M.; THORNE, G.M. Daptomycin in vitro susceptibility methodology: a review of methods, including determination of calcium in testing media. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 32, n. 21, p. 161-169, 2010.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, cap.26. p.1279-1293, 2001.

LU, W. et al. Kinetic analysis and modeling of daptomycin batch fermentation by *Streptomyces roseosporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 163, p.453-462, 2011.

MARTENS-LOBENHOFFER, J. et al. Validated high performance liquid chromatography-UV detection method for the determination of daptomycin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v.875, 546-550, 2008

OLSZOWY, P. et al. New coated SPME fibers for extraction and fast HPLC determination of selected drugs in human blood. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 53, 1022-1027, 2010.

RYBAK, M.J. et al. Pharmacokinetics and bactericidal rates of daptomycin and vancomycin in intravenous drug abusers being treated for Gram-positive endocarditis and bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n.5, p. 1109-1114, 1992.

SAKOULAS, G. Clinical outcomes with daptomycin: a post-marketing, real-world evaluation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n.6, p. 11-16, 2009.

SPELLBERG, B.et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: A call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, p. 155-164, 2008.

STEENBERGEN, J.N.et al. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, p. 283-288, 2005.

TOBIN, C.M.et al. An HPLC assay for daptomycin in serum. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.1462-1476, 2008.

VERDIER, M.C.et al. Determination of daptomycin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clinical application. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, n.1, p.69-75, 2011

USP 36. The United States Pharmacopeia, 32<sup>nd</sup>.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2013.









## 7.1 Introdução

Nos capítulos anteriores foram apresentados o desenvolvimento e validação dos métodos de CLAE e microbiológico para doseamento da daptomicina. Neste capítulo será abordado o desenvolvimento de metodologia por espectrofotometria no UV.

A espectrofotometria na região do UV é um método robusto aplicado à identificação e quantificação de fármacos em formulações, apesar de possuir algumas limitações, pois depende da presença de grupamentos cromóforos na estrutura do composto analisado. Essa técnica é utilizada no controle de qualidade na indústria farmacêutica, em ensaios que englobam o doseamento, a determinação do pKa, do coeficiente de partição, da solubilidade e do tempo de dissolução de medicamentos (WATSON, 2005).

É um método que atende as demandas da indústria de medicamentos, que exige rapidez e confiabilidade nos resultados. Além disso, possui baixo custo operacional, sendo de fácil utilização e produz resultados de interpretação bastante simples. Algumas limitações do método como a baixa especificidade, podem ser solucionadas com a utilização de derivada (SKOOG et al., 2002; WATSON, 2005).

Na literatura são reportados vários métodos por espectrofotometria no UV para doseamento de diferentes fármacos. A Farmacopeia Britânica e a Farmacopeia Brasileira são exemplos de compêndios oficiais que recomendam a espectrofotometria como método de doseamento para vários fármacos, em matérias-primas e medicamentos nos quais não ocorre a interferência dos excipientes.

Em virtude da ausência de metodologias voltadas aos doseamento deste fármaco e da simplicidade e baixo custo desta metodologia, o objetivo foi desenvolver e validar um método por espectrofotometria na região do UV para doseamento da daptomicina.

## 7.2. Experimental

### 7.2.1 Substâncias químicas, amostra e reagentes

A SQR utilizada no desenvolvimento deste trabalho foi produzida pela Hisun Pharmaceutical (Xukow Town, China) e gentilmente cedida pela Cristália (Itapira, São Paulo). A amostra empregada consistiu em frascos-ampola na concentração de 500 mg de daptomicina, comercializada sob o nome de Cubicin<sup>®</sup> (Novartis), lote 900403FL com

validade até 05/13. Para diluição das amostras e SQR, bem como na preparação das soluções foi utilizada água ultrapura.

### *7.2.2 Equipamento*

O método foi desenvolvido em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 e a leitura das soluções foi realizada em 261 nm.

### *7.2.3 Preparo das soluções SQR e amostra*

Prepararam-se soluções estoque da daptomicina SQR em água, na concentração de 200 µg/mL. A solução de trabalho foi obtida pela diluição dessa solução em água à concentração de 50 µg/mL. Para o preparo da solução amostra, pesou-se o equivalente a 20 mg da amostra comercial de daptomicina, diluiu-se em água concentração de 200 µg/mL, Após, diluiu-se a 50 µg/mL, em água , para obtenção da solução de trabalho.

### *7.2.4 Validação do método analítico*

#### *7.2.4.1 Especificidade*

A amostra de daptomicina injetável (Cubicin<sup>®</sup>) contém hidróxido de sódio (NaOH) como excipiente, em quantidade correspondente a cerca de 10% da massa total do pó, sendo o único excipiente informado na bula. Para avaliação da especificidade do método analisaram-se uma solução com 50 µg/mL da SQR e uma solução com 50 µg/mL de SQR à qual foi adicionado NaOH, de modo a mimetizar a formulação, ambas diluídas em água. Realizou-se varredura entre 200 e 400 nm a fim de verificar possível interferência do excipiente na determinação da daptomicina.

#### 7.2.4.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada pelo preparo de três curvas analíticas com cinco concentrações de SQR no intervalo de 20 a 100 µg/mL (20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL) em triplicata, utilizando água como diluente. A absorvância das soluções foi determinada no comprimento de onda de 261 nm, seguida de análise estatística por ANOVA.

#### 7.2.4.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação, onde diferentes concentrações de SQR foram adicionadas a soluções de amostra, cuja concentração foi constante. As soluções acrescidas de SQR foram denominadas R1, R2 e R3, cuja concentração final foi de 35, 50 e 65 µg/mL, correspondente a 70, 100 e 130% da concentração usual de análise. As soluções foram preparadas de acordo com o item 7.2.3 e o esquema de preparo das soluções usadas na determinação da exatidão está especificado na Tabela 7.1. O ensaio foi realizado em triplicata e foi utilizada água como diluente.

Tabela 7.1 - Preparo das soluções para o ensaio de recuperação

	<b>Solução estoque Amostra (200 µg/mL)</b>	<b>Solução estoque SQR (200 µg/mL)</b>	<b>Balão volumétrico</b>	<b>Concentração final</b>
<b>SQR</b>	-	5 mL	20 mL	50 µg/mL
<b>Amostra</b>	2 mL	-	20 mL	20 µg/mL
<b>R1 (70%)</b>	2 mL	1,5 mL	20 mL	35 µg/mL
<b>R2 (100%)</b>	2 mL	3,0 mL	20 mL	50 µg/mL
<b>R3 (130%)</b>	2 mL	4,5 mL	20 mL	65 µg/mL

O percentual de recuperação foi calculado de acordo com a equação 1:

$$\% \text{ daptomicina} = A_a \times C_{SQR} \times 100 / A_{SQR} \times C_a \quad \text{(Equação 1)}$$

onde:

$A_a$  = absorvância da solução da amostra

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

$A_{SQR}$  = absorvância da solução da SQR

$C_a$  = concentração teórica da solução da amostra

#### 7.2.4.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade (precisão intra-dia) foi determinada através da análise de seis amostras independentes na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , preparadas pelo mesmo analista e no mesmo dia.

A precisão intermediária (inter-dias) foi determinada através do preparo de seis amostras independentes na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , preparadas por outro analista, em dias diferentes. As amostras foram preparadas de acordo com o item 7.2.3. Foram observados os valores do desvio padrão relativo ( $\text{DPR} \leq 2$ ).

#### 7.2.4.5 Robustez

Foram realizadas determinações quantitativas de soluções amostra com concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , realizando leituras em comprimentos de onda próximos ao de leitura. Sendo assim, a determinação da robustez foi avaliada nos comprimentos de onda de 260, 261 e 262 nm.

#### 7.2.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%.

## 7.3 Resultados e discussão

### 7.3.1 Otimização do método

A varredura do espectro na região do UV indicou que a daptomicina apresenta três máximos de absorção, como demonstra a Figura 7.1. Escolheu-se como comprimento de onda para leitura 261 nm, pelo formato da banda e sua posição no espectro.

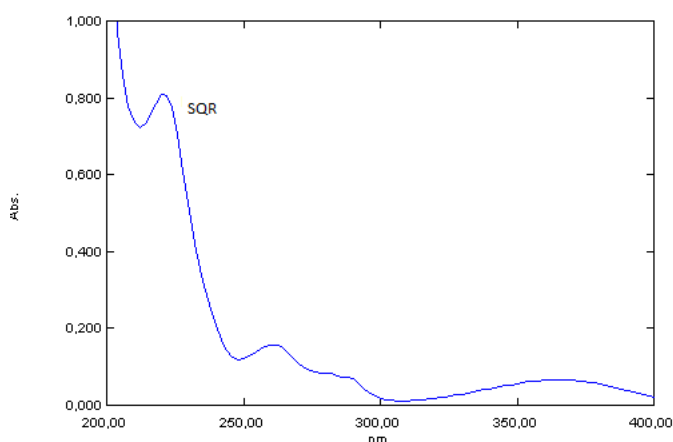


Figura 7.1 - Espectro obtido para solução de SQR de daptomicina (25 µg/mL)

Para a determinação do diluente adequado, avaliou-se o comportamento da daptomicina em diferentes solventes, como ilustra a Figura 7.2. Os espectros do fármaco em água, metanol e hidróxido de sódio foram semelhantes. Em ácido clorídrico observou-se efeito hipocrômico do pico em 261 nm, o que impossibilita a análise nesse diluente, nesse comprimento de onda. O solvente escolhido como diluente foi a água, pela facilidade de obtenção e redução do uso de solventes orgânicos.

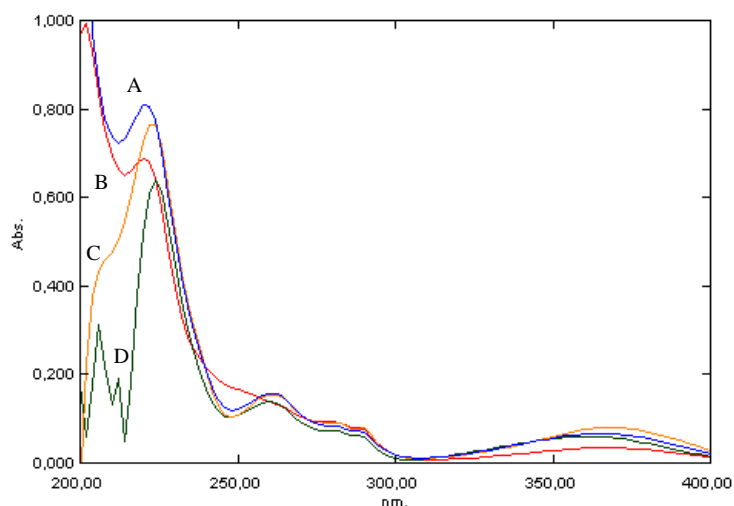


Figura 7.2– Espectro da daptomicina na região do ultravioleta, em diferentes solventes: (A) água, (B) ácido clorídrico 0,1 M, (C) metanol e (D) hidróxido de sódio 0,1M (25 µg/mL)

### 7.3.2 Validação do método

#### 7.3.2.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da pesquisa da possível interferência do excipiente, hidróxido de sódio, utilizado na formulação da daptomicina. Na Figura 7.3 são apresentados os espectros de absorção das soluções de daptomicina com e sem o excipiente da formulação. Observou-se sobreposição das bandas de absorção das duas soluções, indicando a não interferência do excipiente em toda a extensão do espectro no UV, confirmando a especificidade do método.

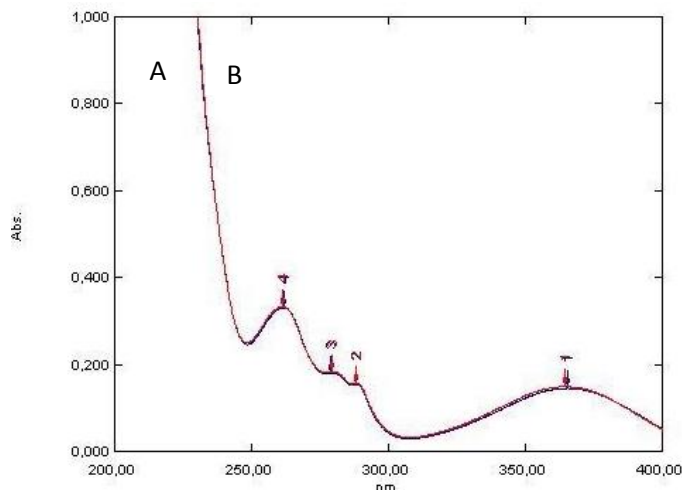


Figura 7.3 – Espectros obtidos para (A) solução de SQR (50 µg/mL) e (B) solução de SQR (50 µg/mL) acrescida de NaOH

### 7.3.2.2 Linearidade

A linearidade foi determinada através de três curvas analíticas, obtidas através das leituras da absorvância em 261 nm de diferentes concentrações do padrão. Foram plotados gráficos da concentração *versus* absorvância, os quais demonstram haver linearidade adequada na faixa de 20 a 100 µg/mL. A equação da reta para o método foi  $y = 0,0063x - 0,0029$ , sendo  $x$  a concentração e  $y$  a absorvância. O coeficiente de correlação foi igual a 0,9998.

Os resultados da ANOVA (Tabela 7.2) indicam que o método é linear, apresentando resultados estatísticos aceitáveis, sendo a regressão significativa e o desvio de linearidade não significativo.

Tabela 7.2 – Análise estatística (ANOVA) para 3 curvas analíticas

FONTE DE VARIACÃO	gl	SOMA DOS QUADRADOS	VARIÂNCIA	F calculado	F tabelado
Entre	4	0,481572623	0,120393156	5127,6224*	3,48
Regressão linear	1	0,481409336	0,481409336	20503,5352*	4,96
Desvio de linearidade	3	$1,63 \cdot 10^{-4}$	$5,44288 \cdot 10^{-5}$	2,3182	3,71
Resíduo	10	0,000234793	$2,34793 \cdot 10^{-5}$		
<b>Total</b>	14	0,481807416			

\*Significativo para  $p < 0,05$

### 7.3.2.3 Precisão

Este parâmetro foi avaliado em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-dias) e precisão intermediária (inter-dias), e os resultados são apresentados na Tabela 7.3.

Os valores de DPR intra-dias e entre dias foram inferiores a 2%. O teor médio para o lote (n=12) foi de 98,98%, com DPR de 1,36%, evidenciando a precisão do método analítico.

Tabela 7.3 - Valores experimentais obtidos na avaliação da precisão do método

Amostra	Dia	Teor (%)	Média (%) $\pm$ DP	DPR
1		98,71		
2		98,07		
3	1	100,07	99,70 $\pm$ 1,39	1,39
4		100,10		
5		99,19		
6		102,04		
1		99,99		
2	2	98,06		
3		98,25		
4		97,94		
5		97,31		
6		98,04		
<b>Média entre dias (%) <math>\pm</math> DP</b>			<b>98,98 <math>\pm</math> 1,35</b>	<b>1,36</b>

### 7.3.2.4 Exatidão

A exatidão do método proposto foi avaliada através do teste de recuperação. A porcentagem média para o ensaio de recuperação foi de 100,60  $\pm$  1,5%, demonstrando que os resultados obtidos estão dentro da faixa de recuperação estabelecida (98 - 102%), conforme ilustrado pela Tabela 7.4.



Tabela 7.4 – Valores experimentais do ensaio de recuperação do método de doseamento por espectrofotometria no UV da daptomicina injetável

Nível	Concentração adicionada de SQR ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração recuperada de SQR ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
		14,46	96,40		
70%	15	15,07	100,46	99,04	3,20
		15,04	100,27		
		30,75	102,50		
100%	30	30,23	100,77	101,36	0,19
		30,24	100,80		
		45,52	101,15		
130%	45	45,81	101,80	101,41	0,59
		45,58	101,29		
<b>Percentual médio (%) <math>\pm</math> DP</b>				<b>100,60 <math>\pm</math> 1,72</b>	<b>1,71</b>

### 7.3.2.5 Robustez

O parâmetro utilizado para avaliar a robustez do método foi a alteração do comprimento de onda utilizado na determinação da daptomicina. Os resultados obtidos demonstram não haver evidência de diferença significativa na quantificação da amostra com as alterações realizadas ( $p = 0,8608$ ) e apresentam DPR de 0,19%, demonstrando assim, que o método é robusto (Tabela 7.5).

Tabela 7.5 - Valores experimentais obtidos na robustez

	260 nm	261 nm	262 nm	DPR
<b>Teor (%) Amostra 1</b>	98,34	98,68	98,36	0,19
<b>Teor (%) Amostra 2</b>	98,03	98,02	98,04	0,01

## 7.4 Conclusão

Os resultados indicaram que o método por espectrofotometria no ultravioleta desenvolvido e validado é específico, linear, preciso, robusto e exato para a análise quantitativa de daptomicina injetável. Pela não interferência do excipiente, o método pode ser aplicado como método de identificação da formulação.

Esse método pode representar uma alternativa aos outros métodos desenvolvidos, por ser um método simples, rápido, robusto e que não emprega solventes orgânicos.

## 7.5 Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.** Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução – RDC nº 20, de 5 de maio de 2011.** Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. 2011.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q2R1: **Guideline on Validation of Analytical Procedure – Methodology**, 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental. Tradução Ignez Caracelli et al. 5ª ed. Porto Alegre, Bookman, 2002.

WATSON, D. G. Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.





## 8. DISCUSSÃO GERAL

O aumento da resistência dos microrganismos frente aos antimicrobianos é motivo de preocupação em vários países do mundo e tem levado as autoridades a tomar algumas providências. Em 2011, no Brasil, a ANVISA vinculou a venda de antimicrobianos à retenção de receita médica, visando diminuir o uso indiscriminado dessas substâncias e driblar a resistência dos microrganismos. Já nos EUA a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) lançou uma campanha para desenvolvimento de novos antibióticos (BOUSCHER et al., 2013).

A resistência dos microrganismos e a diminuição do desenvolvimento de novos antibióticos, principalmente com diferentes mecanismos de ação, tornam os novos fármacos antimicrobianos aprovados para a comercialização, que são poucos, de extrema importância no tratamento de infecções bacterianas. Dessa forma, é importante obter métodos confiáveis para averiguar a qualidade destes novos agentes.

Métodos analíticos são imprescindíveis em várias etapas da produção de medicamentos, passando pela análise da matéria-prima e do produto acabado, controle em processo, estudos de estabilidade e métodos voltados às características físico-químicas, como ensaios de dissolução, entre outros. É fundamental garantir que métodos cromatográficos como CLAE, métodos não cromatográficos, mas com seletividade aceitável (como espectrofotometria no UV) e métodos microbiológicos sejam validados de acordo com as guias vigentes (ICH 2005; FB 5 2010).

Esse trabalho foi iniciado pela caracterização da matéria-prima a ser usada como substância química de referência. Consideradas em conjunto, as análises realizadas permitiram a caracterização da mesma, sendo que foram realizadas técnicas ainda não reportadas na literatura para a daptomicina e que podem servir como base para estudos futuros. Apesar de sua simplicidade, a determinação da solubilidade foi importante para a escolha dos solventes a serem utilizados durante as análises quantitativas.

Na análise quantitativa de antibióticos podem ser empregados métodos físico-químicos como CLAE e espectrofotometria no UV, além de métodos microbiológicos (turbidimétrico e difusão em ágar). Os métodos físico-químicos apresentam algumas vantagens como o tempo reduzido para avaliação do resultado e a robustez característica de suas metodologias, mas apresentam como desvantagens o alto custo dos equipamentos e a impossibilidade de demonstrar a atividade biológica dos antibióticos. Já os métodos

biológicos, apesar de necessitarem de mais tempo para análise dos resultados, empregam equipamentos de baixo custo e têm a possibilidade de demonstrar a atividade biológica dos produtos (BAIRD, HODGES, DENYER, 2000). Na ausência de métodos disponíveis para o controle de qualidade da daptomicina o objetivo foi desenvolver tanto métodos físico-químicos como biológicos voltados ao controle de qualidade e ações de farmacovigilância, importantes nos primeiros anos de comercialização de novos fármacos, buscando garantir a qualidade e segurança deste novo antibiótico.

Existem muitos métodos, anteriormente relatados, que utilizam cromatografia líquida de alta eficiência para doseamento do fármaco em questão em fluidos biológicos. A literatura anteriormente citada foi utilizada nos estudos prévios para desenvolvimento do método por CLAE, servindo como base para a determinação da coluna cromatográfica e solvente a serem empregados na fase móvel.

Os primeiros ensaios para validação do método empregaram coluna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) e fase móvel metanol:solução aquosa de ácido fórmico 0,1% pH 3,5 (50:50 v/v) em fluxo de 1 mL/min. Essa combinação de fatores resultou em um tempo de retenção superior a 2 horas e levou a uma série de novas tentativas, a exemplo: mudança na fase móvel para metanol, acetonitrila e solução aquosa de ácido fórmico (60:10:30 v/v/v), com fluxo variando de 0,8 a 1,5 mL/min; diminuição da apolaridade da coluna, tendo sido usada coluna C8 (200 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) com a mesma fase móvel e fluxo variando também da mesma forma. A condição final escolhida foi diferente das tentativas iniciais: coluna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), fase móvel composta por acetonitrila: solução aquosa de ácido fórmico 0,1%, pH 3,5 (80:20 v/v), com fluxo de 1 mL/min. Nestas condições, o tempo de retenção foi de aproximadamente 8 minutos. Todos os ensaios foram realizados com a coluna em temperatura ambiente.

A validação do método por CLAE iniciou com as últimas condições citadas, porém já na especificidade do método observou-se que o mesmo não seria adequado para o uso pretendido. Durante avaliação da amostra submetida à degradação em solução alcalina houve eluição simultânea do pico atribuído à daptomicina e seu possível produto de degradação. Novos ensaios foram realizados, utilizando diferentes condições e as estabelecidas ao final foram: coluna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), fase móvel composta por metanol, acetonitrila e tampão fosfato 0,01 M pH 2,2 (40:30:30 v/v/v) e fluxo de 1 mL/min. Optou-se por substituir a solução de ácido fórmico (pH 3,5) por tampão fosfato pH 2,2, em virtude dos pKas da daptomicina (pKa ácido 4,00 e pKa alcalino 10,00), prevenindo assim a ionização dos grupamentos ácidos da molécula. Empregando essas condições foi obtido um bom tempo de

retenção (6,1 min), boa eficiência (pratos teóricos > 7000), e fator de cauda adequado (<2), sendo que esse fator foi determinante para descartar boa parte das tentativas anteriores.

As novas condições estabelecidas foram adequadas ao desenvolvimento e validação do método proposto. Na especificidade foi possível separar o pico da daptomicina de seu produto de degradação na condição alcalina e nas outras condições de degradação testadas, com detecção realizada através do DAD indicando a pureza dos picos (>0,999). O método mostrou-se linear na faixa determinada (10 a 50µg/mL), preciso ( $100,23 \pm 0,59\%$ ) e exato, com recuperação média igual a  $99,17 \pm 1,25\%$ .

Na determinação da robustez do método por CLAE optou-se por empregar um fatorial  $2^3$ , sendo testados três fatores (pH da fase móvel, fluxo e concentração de metanol na fase móvel) em dois níveis (10% acima e abaixo da condição otimizada), empregando três pontos centrais. A avaliação da robustez tradicional envolve um grande número de execuções independentes e não considera possíveis interações entre os fatores. Já em um planejamento fatorial são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta ou nas respostas (LARA et al., 2005; TEÓFILO; FERREIRA, 2005). O parâmetro escolhido para verificar a robustez do método foi o teor (100,59%), mas também foram observados outros como assimetria e pratos teóricos. Ao final de todas as análises foi possível concluir que o método por CLAE proposto provou ser linear, específico, exato, preciso e robusto.

Para o desenvolvimento do método microbiológico, o objetivo inicial era o desenvolvimento de método por difusão em ágar, utilizando cilindros em placa, que é o método microbiológico de escolha para o doseamento de antimicrobianos (BAIRD et al., 2000). Foram realizados ensaios preliminares procurando determinar as seguintes condições: tipo e volume adequado do meio de cultura, concentração das soluções padrão e amostra, concentração do inóculo, tempo de incubação e volume a ser adicionado aos cilindros. Além destas condições, também foi necessário avaliar a concentração de cálcio a ser adicionada ao meio de cultura, uma vez que o mecanismo de ação da daptomicina é dependente de cálcio. Alguns estudos anteriores já haviam demonstrado a necessidade de sua presença em ensaios de sensibilidade (FUCHS et al., 2000; KOETH; THORNE, 2010). A confirmação da necessidade de cálcio nos ensaios microbiológicos foi verificada comparando ensaios preliminares com e sem a adição de cálcio.

Após uma série de ensaios, foram estabelecidas as condições para o desenvolvimento do método microbiológico, sumarizadas no Quadro 8.1. O delineamento empregado foi o 3x3.

Parâmetro	Condição
Meio de cultura	Meio antibiótico n°1 (camada semeada) Meio antibiótico n°2 (camada base)
Volume de meio de cultura	5 mL para camada semeada 10 mL da camada base
Concentração SQR e amostra	8, 16 e 32 µg/mL
Volume adicionado aos cilindros	100 µL
Microrganismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538p
Concentração de inóculo	0,5%
Concentração de cálcio (50 µg/mL)	500 µL/100mL
Diluyente	Tampão fosfato pH 6
Incubação	18h – 32°±2C

Quadro 8.1–Condições estabelecidas para desenvolvimento do método por difusão em ágar

O método microbiológico por difusão em ágar proposto apresentou boa linearidade no intervalo analisado (8 a 32µg/mL) e precisão aceitável (DPR ±1,42%), apesar do teor encontrado por esta metodologia ser menor do que o obtido nas outras. O fator limitante para a validação deste método foi a exatidão, uma vez que o método demonstrou não ser exato. A dificuldade em determinar a exatidão das leituras e conseqüentemente do método, foi atribuída à baixa difusão da molécula, possivelmente em função de seu alto peso molecular (KOETH; THORNE, 2010). Alguns autores sugerem que aumentando o tempo de pré-difusão da molécula é possível obter halos maiores, porém, realizaram-se tentativas nesse sentido, alterando o tempo de pré-difusão, de 30 min para 3 horas, e não houve mudança no tamanho dos halos de inibição (SOLANO, 2008). Na rotina do controle de qualidade é preferível que os resultados sejam obtidos com a maior velocidade possível, por isso optou-se por outra metodologia ao invés de realizar novas tentativas com maior tempo de pré-difusão.

O método turbidimétrico apresenta vantagens frente ao método de difusão em ágar: é mais sensível, já que responde a concentrações menores do antibiótico e o teor do antibiótico é conhecido em menos tempo; porém, apresenta como desvantagem a impossibilidade de ser utilizado em amostras que apresentem coloração ou turbidez (SOLANO, 2008). Uma vez que a daptomicina não apresenta coloração ou turbidez, o método turbidimétrico pode ser empregado.



O procedimento utilizado no desenvolvimento desta metodologia foi o mesmo empregado anteriormente, partindo de ensaios preliminares para determinação das condições adequadas. Foram escolhidos: delineamento 3x3 com SQR e amostra nas concentrações de 1,2 e 4 µg/mL, meio de cultura n°3, 5 horas de incubação a 37°C, com inóculo a 1%. A concentração de cálcio e microrganismo foram as mesmas do ensaio por difusão em ágar. Para este segundo método microbiológico foi obtido um teor médio de  $100,96 \pm 2,58\%$  (DPR = 2,55%). O método mostrou-se linear no intervalo avaliado (1 a 4 µg/mL), exato, com um percentual de recuperação de  $100,48 \pm 2,10\%$  (DPR = 2,09%) e também robusto, em relação aos fatores avaliados: tempo de incubação e concentração de cálcio.

O terceiro método validado foi por espectrofotometria no UV. Este método é bastante simples e apresenta baixo custo, podendo ser empregado facilmente em indústrias farmacêuticas. Na validação do mesmo empregou-se água como diluente para a daptomicina e efetuou-se a leitura das amostras em 261nm. Os resultados obtidos para este método também foram bastante satisfatórios: mostrou-se linear no intervalo entre 20 e 100 µL, específico em relação ao excipiente, preciso ( $98,98 \pm 1,35\%$ , DPR 1,36%), exato ( $100,60 \pm 1,72\%$ ) e robusto.

Os resultados obtidos na determinação da precisão dos três métodos desenvolvidos são apresentados na Tabela 8.1.

Tabela 8.1 – Comparação dos métodos de análise por CLAE, microbiológico e espectrofotometria no UV para doseamento da daptomicina

Amostras	CLAE	Microbiológico	UV
1	99,97	100,88	98,71
2	100,81	100,22	98,07
3	100,55	98,15	100,07
4	99,43	99,18	100,10
5	99,33	97,22	99,19
6	100,90	97,72	102,04
7	100,32	102,64	99,99
8	99,86	104,38	98,06
9	99,48	104,31	98,25
10	100,69	104,11	97,94
11	100,89	102,02	97,31
12	100,51	100,65	98,04
<b>Média</b>	<b>100,23</b>	<b>100,96</b>	<b>98,98</b>
<b>DPR</b>	<b>0,59</b>	<b>2,58</b>	<b>1,36</b>

Os resultados obtidos para os três métodos foram comparados estatisticamente por ANOVA. Foi observada uma diferença significativa entre os testes ( $p < 0.05$ ) e então, dois a dois, os métodos foram comparados pelo teste *t-Student*, com nível de significância de 5%. Os resultados revelam que não há diferença significativa entre os métodos microbiológico e CLAE ( $p = 0,208$ ). Uma vez que os mesmos atenderam a todos os parâmetros de validação e são métodos indicativos de estabilidade, pode-se concluir que os dois métodos são adequados tanto para análises de rotina quanto para estudos de estabilidade da daptomicina. Quanto ao método espectrofotométrico, houve diferença significativa entre ele e os outros métodos propostos:  $p = 0,0252$ , comparado ao método microbiológico e  $p = 0,00089$  ao método por CLAE. Sendo assim, sugere-se que o método por espectrofotometria no UV possa ser usado para o doseamento da daptomicina, uma vez que o teor encontrado está dentro dos limites preconizados (90-110%) e que foi muito próximo dos obtidos pelos demais métodos. Porém seu uso não é recomendado em estudos de estabilidade.

Após a validação dos métodos também foi avaliada a cinética de degradação da daptomicina em meio alcalino, utilizando os métodos de CLAE e microbiológico. As reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e dependem de várias condições como concentração dos reagentes, temperatura, pH, radiação ou presença de catalizadores (LACHMAN et al., 2001). Para obtenção das ordens de reação foram plotados três gráficos: concentração x tempo (ordem zero),  $\ln$  concentração x tempo (primeira ordem) e  $1/\text{concentração}$  x tempo (segunda ordem). Experimentalmente, soluções amostra de daptomicina foram misturadas com soluções de NaOH 0,01M e após os tempos determinados foram neutralizadas com HCl 0,1M. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 8.2.

Tabela 8.2 - Cinética de degradação da daptomicina em meio alcalino (NaOH 0,01 M) obtida pelos métodos de CLAE e microbiológico

	<b>CLAE</b>	<b>Microbiológico</b>
<b>Ordem de reação</b>	Primeira ordem	Primeira ordem
<b>t50%</b>	130,81 min	128,37 min
<b>t90%</b>	22,55 min	19,63 min
<b>k</b>	0,0053	0,0055

Pode-se observar que os resultados obtidos para a ordem de reação, t50% e t90% são bastante semelhantes nos dois métodos avaliados. Para os cálculos foram utilizadas as

equações  $t_{1/2} = 2,303/k \log C_0/C$  e  $t_{90\%} = 0.106/k$  para o t50% e para o t90%, respectivamente, sendo  $k$  a constante de degradação,  $C_0$  a concentração inicial e  $C$  a concentração no tempo determinado. Os resultados obtidos através das equações foram condizentes com os resultados obtidos experimentalmente. Os resultados mostram que a daptomicina segue cinética de degradação de primeira ordem, nas condições usadas, o que indica que a velocidade de reação depende da concentração do reagente (LACHMAN et al., 2001). Ou seja, a velocidade de degradação pode ser aumentada pelo aumento da concentração do agente degradante. Isso pode ser particularmente importante quando se busca a inativação de soluções do fármaco, antes do seu descarte, por exemplo. As análises das soluções degradadas pelo método microbiológico indicaram que a amostra degradada da daptomicina é destituída de ação antimicrobiana.







## 9. CONCLUSÕES

- A avaliação da solubilidade da daptomicina (SQR), a espectrofotometria no UV, o ponto de fusão, a espectrofotometria no IV e a calorimetria diferencial exploratória permitiram caracterizar esta substância e fornecer alguns dados até então indisponíveis na literatura;
- O método por CLAE para determinação quantitativa da daptomicina na forma comercial foi validado, mostrando ser específico, exato, preciso, robusto e linear na faixa estudada, além de ser indicativo de estabilidade;
- O método microbiológico para determinação quantitativa também foi validado e da mesma forma mostrou ser específico, exato, preciso, robusto e linear na faixa estudada, sendo também indicativo de estabilidade;
- O terceiro método desenvolvido, por espectrofotometria no UV, foi validado mostrando ser exato, preciso, específico em relação ao excipiente, robusto e linear na faixa estudada;
- A condição mais adversa à estabilidade da daptomicina é o meio alcalino, uma vez que a molécula é rapidamente degradada nesse meio. O(s) produto(s) de degradação do fármaco não tem ação antimicrobiana.
- A avaliação da cinética de reação (método por CLAE e microbiológico) indicou que a degradação da daptomicina segue cinética de primeira ordem em meio alcalino, nas condições usadas;
- Os métodos por HPLC e microbiológico provaram ser intercambiáveis e podem ser usados para o controle de qualidade da daptomicina;
- O método por espectrofotometria na região do UV não mostrou ser intercambiável com os outros dois, mesmo assim apresentou um teor para o lote analisado dentro dos limites aceitáveis (90 a 110%). Desta forma, o método espectrofotométrico não é indicado para uso em estudos de estabilidade, mas pode ser usado para doseamento do antibiótico.









## 10. REFERÊNCIAS

BAIETTO, L. et al. 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.

BAIRD, R.M.; HODGES, N.A.; DENYER, S.P. Handbook of Microbiological Quality Control : CRC Press. p.190-204, 2000.

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

BALTZ, R.H.; MIAO, V.; WRIGLEY, S.K. Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics. **The Royal Society of Chemistry**, v.22, p. 717-741, 2005.

BALTZ, R.H. Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering. **Current opinion in Chemical Biology**, v. 13, p. 144-151, 2009.

BAZOTI, F.N.et al. 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.

BOUCHER, H.W. et al. 10 X '20 Progress – Development of new drugs active against gram-negative bacilli: An update from the infectious diseases society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 56, n.12, p.1685-1694, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.**Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. 2003.

BURKHARDT, O.et al. Elimination of daptomycin in patient with acute renal failure undergoing extended daily dialysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 224-225, 2008.

CHA, R.; RYBAK, M.J. Daptomycin against multiple drug-resistant staphylococcus and enterococcus isolates in an in vitro pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, p. 539-546, 2003.

CUBICIN: pó para infusão ou injeção. Farm. Resp.: Bárbara Santos de Sousa. São Paulo, Novartis, 2011. Bula de remédio.

DEBONO, M. et al. A21978C, a complex of new acidic peptide antibiotics: Isolation, chemistry, and mass spectral structure elucidation. **The Journal of Antibiotics**, v.40, n.6, p. 761-777, 1987.

DERYKE, C.A. et al. Serum bactericidal activities of high-dose daptomycin with and without co administration of gentamycin against isolates of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.11, p.3529-3534, 2006.

DORTET, L. et al. In vivo acquired daptomycin resistance during treatment of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. **International Journal of Infectious Diseases**, 2013, *Article in press*

DVORCHIK, B.H. et al. Daptomycin pharmacokinetics and safety following administration of escalating doses once daily to healthy subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p.13-18, 2003.

DVORCHIK, B. et al. Population pharmacokinetics of daptomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2799-2807, 2004.

ELIOPOULOS, G.M. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of LY146032, a new cyclic lipopeptide antibiotic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n. 4, p.53-535, 1986.

EOM, S.H.; KIM, Y-M.; KIM, S-K. Marine bacteria: potential sources for compounds to overcome antibiotic resistance. **Applied Microbiological Biotechnology**, v.97, 4763-4773, 2013.

FALCONE, M. et al. Variability of pharmacokinetic parameters in patients receiving different dosages of daptomycin: in therapeutic drug monitoring necessary? **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2013.

FB 5. **Farmacopéia Brasileira, 5ª edição**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. Vol. 1, 2010.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development – the failure of success? **Nature Biotechnology**, v.24, n. 12, p. 1497-1503, 2006.

FUCHS, P.C.; BARRY, A.L.; BROWN, S.D. Daptomycin susceptibility tests: interpretative criteria, quality control, and effect of calcium in vitro tests. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.38, p.51-58, 2000.

GIKA, H.G. et al. 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. et al., A. Development and validation of a UPLC-UV method for the determination of daptomycin in rabbit plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 24, p. 522-527, 2009.

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.

HANCOCK, R.E.W.; Mechanisms of action of newer antibiotics for gram-positive pathogens. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, p.209-218, 2005.

HANCOCK, R.E.W. The end of an era? **Nature reviews Drug Discovery**, v.6, p. 28, 2007.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q2R1: **Guideline on Validation of Analytical Procedure – Methodology**, 2005.

JUNG, D. et al. Structural transitions as determinants of the calcium-dependent antibiotic Daptomycin. **Chemistry & Biology**, v. 11, 949-957, 2004.

KOETH, L.M.; THORNE, G.M. Daptomycin in vitro susceptibility methodology: a review of methods, including determination of calcium in testing media. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 32, n. 21, p. 161-169, 2010.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, cap.26. p.1279-1293, 2001.

LARA, F.J. et al. Determination of thiazinamium, promazine and promethazine in pharmaceutical formulations using a CZE method. **Analytica Chimica Acta**, v.535, p.101-108, 2005.

LI, C .et al. Preparation and characterization of flexible nanoliposomes loaded with daptomycin, a novel antibiotic, for topical skin therapy. **International Journal of Medicine**, v.8, p.1285-1292, 2013.

MARTENS-LOBENHOFFER, J. et al. Validated high performance liquid chromatography-UV detection method for the determination of daptomycin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v.875, 546-550, 2008.

OLSZOWY, P.et al. New coated SPME fibers for extraction and fast HPLC determination of selected drugs in human blood. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 53, 1022-1027, 2010.

REDER-CHRIST, K. et al. Model membrane approaches to determine the role of calcium for the antimicrobial activity of friulimicin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.37, p. 256-260, 2011.

RYBAK, M.J. et al. Pharmacokinetics and bactericidal rates of daptomycin and vancomycin in intravenous drug abusers being treated for Gram-positive endocarditis and bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n.5, p. 1109-1114, 1992.

SAKOULAS, G. Clinical outcomes with daptomycin: a post-marketing, real-world evaluation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n.6, p. 11-16, 2009.

SAUERMAN, R. et al. Daptomycin: A review 4 years after first approval. **Pharmacology**, v. 81, p.79-91, 2008.

- SEATON, R.A. et al. Daptomycin for outpatient parenteral antibiotic therapy: a European registry experience. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.41, p.468-472, 2013.
- SILVERMAN, J.A. et al. Resistance studies with daptomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.6, p.1799-1802, 2001.
- SIMMONS, K.J.; CHOPRA, I.; FISHWICK, C.W.G. Structure-based discovery of antibacterial drugs. **Nature Reviews of Microbiology**, v.8, n. 7, p. 501-510, 2010.
- SOLANO, A.G.R. Desenvolvimento de métodos microbiológicos para doseamento de gramicidina matéria-prima. 2008. 262 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- STEENBERGEN, J.N. et al. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, p. 283-288, 2005.
- TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova** v. 29, no 2, 338-350, 2006.
- THORNE, G.M.; ALDER, J. Daptomycin: A novel lipopeptide antibiotic. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 24, n. 5, p. 32-40, 2002.
- TOBIN, C.M. et al. An HPLC assay for daptomycin in serum. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.1462-1476, 2008.
- USP 36. The United States Pharmacopeia, 32<sup>nd</sup>.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2013.
- VERDIER, M.C. et al. Determination of daptomycin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clinical application. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, n.1, p.69-75, 2011.
- WANG, Y. et al. Molecular cloning and identification of the laspartomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces virido chromogenes*. **Gene**, v. 483, p. 11-21, 2011.
- WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis. A Textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
- WENISCH, J.M. et al. Multiple-dose pharmacokinetics of daptomycin during continuous venovenous haemodia filtration. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 977-983, 2012.
- WISE, R. et al. Pharmacokinetics and Inflammatory Fluid Penetration of Intravenous Daptomycin in Volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 31-33, 2002.

