

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE TEICOPLANINA EM PÓ  
LIOFILIZADO**

MARIANA HENRIQUE PASSONI

ARARAQUARA - SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE TEICOPLANINA  
EM PÓ LIOFILIZADO**

MARIANA HENRIQUE PASSONI

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

Orientadora: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA - SP

2009

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

P289a Passoni, Mariana Henrique  
Análise químico-farmacêutica de teicoplanina em pó liofilizado /  
Mariana Henrique Passoni. – Araraquara, 2009.  
89 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de  
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

1.Teicoplanina. 2.Métodos analíticos. 3.CLAE. 4.Controle de  
qualidade. I.Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

*Dedico aos meus pais, Ana Maria e Nilson, pelo amor, dedicação, e apoio em todos os momentos importantes da minha vida.*

*À Profa. Hérica Salgado, pela excelente orientação, pelo incentivo frente às dificuldades e acima de tudo por acreditar neste projeto.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, a Deus por iluminar meu caminho.

À minha família querida pelo carinho, paciência e inesgotável suporte nos momentos mais difíceis.

Ao Wellington, pelo amor e companheirismo, que foram imprescindíveis nesta jornada.

À Maria de Fátima Rodrigues, pela amizade, colaboração e apoio.

Aos meus amigos, pelo incentivo e troca de experiências que tiveram grande importância no alcance deste objetivo.

Ao estagiário Alexandre H. Ebina, pela contribuição neste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos que me foram transmitidos.

À Secretaria do Programa de Pós Graduação, pelo apoio técnico.

À Cristalia Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., pela gentil doação dos medicamentos e substância de referência.

## RESUMO

A teicoplanina é um antibiótico glicopeptídico, cujo mecanismo de ação é inibir a síntese da parede celular bacteriana. Esse antibiótico vem sendo bastante utilizado no Brasil no combate a bactérias Gram-positivas multi-resistente a fármacos. Em razão deste fármaco ser relativamente novo no mercado, não há metodologia de análise descrita em compêndios oficiais. Este trabalho apresenta procedimentos para quantificação de teicoplanina em pó para solução injetável. O método espectrofotométrico na região ultravioleta a 279 nm, na faixa de concentração de 60,0 a 110,0 µg/mL ( $r^2 = 0,999$ ), apresentou linearidade, precisão e exatidão, com teor médio no pó para solução injetável de 97,45%. A cromatografia líquida de alta eficiência utilizou coluna C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) e a fase móvel constituída de metanol : acetonitrila (50:50, V/V), na faixa de concentração de 70,0 a 120,0 µg/mL ( $r^2 = 0,999$ ) e apresentou linearidade, precisão e exatidão, com teor médio no pó para solução injetável de 99,12%. Os dados foram calculados pela análise de variância (ANOVA), permitindo assim aplicação destes métodos no controle de qualidade.

Palavras-Chave: controle de qualidade, teicoplanina, métodos analíticos, CLAE, espectrofotometria na região UV.

## ABSTRACT

Teicoplanin is a glycopeptide antibiotic, which inhibits the bacteria cellular membrane synthesis. This antibiotic is quite new and has been used in Brazil to combat Gram-positive bacteria that are multi-drug resistant. There is not described analytical methodology in official literature. This work reports procedures for the quantification of teicoplanin in pharmaceutical forms. In the UV-spectrophotometry at 279 nm, the Lambert-Beer law was obeyed in the concentration range from 60.0 to 110.0  $\mu\text{g/mL}$  ( $r^2 = 0,999$ ), whose analysis presented linearity, precision and accuracy, with average in powder for injection of 97.45. In the second method, HPLC methods, the samples were injected into a Waters Symmetry  $\text{C}_{18}$  column (4.6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). The mobile phase was consisted of acetonitrile and methanol (50:50, V/V). UV detection was performed at 279 nm, and the samples and reference solutions were prepared in the mobile phase; the calibration curve for teicoplanin was linear from 70.0 to the 120.0  $\mu\text{g/mL}$  range ( $r^2 = 0.999$ ). The procedure presented linearity, precision, accuracy, with average in powder for injection of 99.12%. The statistical data were calculated by analysis of variance (ANOVA), that it allows the application of the analytical methods in the quality control of pharmaceutical preparations.

Key-Words: quality control, teicoplanin, analytical methods, HPLC, UV-spectrophotometry.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XIV
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1. Mecanismo de ação.....	7
2.2. Características farmacocinéticas .....	9
2.3. Usos clínicos.....	11
2.4. Interações .....	13
2.5. Reações adversas .....	13
2.6. Validação .....	15
3. OBJETIVOS .....	19
4. DESCRIÇÃO .....	20
4.1. Substância química de referência.....	20
4.2. Forma farmacêutica .....	20
5. ANÁLISE QUANTITATIVA .....	21
5.1. Material .....	21
5.1.1. Equipamentos .....	21
5.1.2. Matérias-primas, reagentes e solventes .....	21
5.2. Espectrofotometria na região ultravioleta.....	22
5.2.1. Considerações gerais .....	22



5.2.2. Método .....	22
5.2.3. Realização da curva de Ringbom .....	23
5.2.4. Obtenção da curva analítica .....	25
5.2.5. Análise estatística .....	28
5.2.6. Determinação de teicoplanina no pó liofilizado .....	30
5.2.6.1. Preparo da amostra.....	30
5.2.6.2. Cálculo .....	30
5.2.7. Validação do método .....	32
5.2.7.1. Precisão .....	33
5.2.7.2. Recuperação .....	35
5.2.7.2.1. Cálculo de teste de recuperação .....	36
5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência .....	38
5.3.1. Considerações gerais .....	38
5.3.2. Método .....	38
5.3.3. Obtenção da curva analítica .....	40
5.3.4. Análise estatística .....	43
5.3.5. Determinação de teicoplanina no pó liofilizado .....	45
5.3.5.1. Preparo da amostra.....	45
5.3.5.2. Cálculo .....	45
5.3.6. Validação do método .....	47
5.3.6.1. Precisão .....	47
5.3.6.2. Recuperação .....	49
5.3.6.2.1. Cálculo de teste de recuperação .....	50
5.4. Método microbiológico turbidimétrico.....	52
5.4.1. Considerações gerais .....	52
5.4.2. Preparação do inoculo .....	52
5.4.3. Preparação das soluções.....	52

5.4.4. Método .....	53
6. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS .....	57
7. DISCUSSÃO .....	60
8. CONCLUSÃO .....	65
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da vancomicina.....	2
Figura 2 - Estrutura química da teicoplanina. ....	3
Figura 3 - Local de ação dos antibióticos que interferem na síntese da parede celular bacteriana. ....	8
Figura 4 - Espectro de absorção na região ultravioleta de teicoplanina em solução aquosa 90,0 µg/mL.....	23
Figura 5 - Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta para solução de teicoplanina substância de referência de 1,0 à 300,0 µg/mL.....	25
Figura 6 - Representação gráfica da curva analítica da solução de teicoplanina pelo método espectrofotométrico na região ultravioleta a 279 nm.....	28
Figura 7 - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de teicoplanina substância de referência (A) e amostra (B) (90 µg/mL). ....	40
Figura 8 - Representação gráfica da curva analítica da solução de teicoplanina em concentrações de 70,0 a 120,0 µg/mL por CLAE. ....	43
Figura 9 - Representação gráfica da curva analítica obtida através do ensaio microbiológico por turbidimetria.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Preparo das soluções utilizadas na construção da curva de Ringbom de teicoplanina.....	24
Tabela 2 - Preparo da curva analítica de teicoplanina através de espectrofotometria no ultravioleta a 279 nm.....	26
Tabela 3 - Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de teicoplanina através de espectrofotometria no ultravioleta a 279 nm. ....	27
Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) das absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica da teicoplanina através do método espectrofotométrico na região ultravioleta a 279 nm.....	29
Tabela 5 - Parâmetros analíticos utilizados na determinação de teicoplanina através de método espectrofotométrico na região ultravioleta a 279 nm.....	30
Tabela 6 - Teor de teicoplanina em 200 mg de pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região ultravioleta a 279 nm. ....	32
Tabela 7 - Preparo das soluções de teicoplanina em concentração de 80,0 a 110,0 µg/mL, para o ensaio de precisão, pelo método de espectrofotometria na região UV a 279 nm.....	34
Tabela 8 - Valores experimentais da teicoplanina pó liofilizado, obtidos por espectrofotometria na região UV. ....	34
Tabela 9 - Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de teicoplanina para método de espectrofotometria na região UV a 279 nm.....	36

Tabela 10 - Teste de recuperação de solução de teicoplanina substância de referência adicionada à solução de teicoplanina frasco-ampola pelo método espectrofotométrico na região ultravioleta a 279 nm. ....	37
Tabela 11 - Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método por CLAE. ....	39
Tabela 12 - Preparo da curva analítica de teicoplanina em concentração de 70,0 a 120,0 µg/mL, por CLAE. ....	41
Tabela 13 - Áreas absolutas determinadas na obtenção da curva analítica de teicoplanina por CLAE. ....	42
Tabela 14 - Análise de variância das áreas determinadas na obtenção da curva analítica de teicoplanina através do método CLAE. ....	44
Tabela 15 - Parâmetros analíticos utilizados na determinação de teicoplanina pelo de método CLAE. ....	44
Tabela 16 – Quantidade determinada para doseamento de pó liofilizado de 200 mg de teicoplanina através de CLAE. ....	46
Tabela 17 - Preparo ensaio de precisão de teicoplanina em concentração de 100,0 a 120,0 µg/mL por CLAE. ....	48
Tabela 18 - Valores experimentais da teicoplanina pó liofilizado, obtidos por CLAE. ....	48
Tabela 19 - Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de teicoplanina para método de CLAE. ....	50
Tabela 20 - Teste de recuperação de solução de teicoplanina substância de referência adicionada à solução de teicoplanina frasco-ampola pelo método CLAE. ....	51

Tabela 21 - Preparo das soluções utilizadas nos testes preliminares do ensaio microbiológico por turbidimetria.....	53
Tabela 22 - Absorvâncias determinadas nos testes preliminares do ensaio microbiológico por turbidimetria.....	54
Tabela 23 - Resultados experimentais obtidos na validação dos métodos propostos.....	57
Tabela 24 - Quantidade determinada para doseamento de pó liofilizado de 200 mg de teicoplanina através dos métodos, espectrofotometria na região UV e CLAE. ....	58
Tabela 25 – Análise de variância do teor de teicoplanina pó liofilizado obtido pelos dois métodos propostos. ....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorvância
CAS	<i>Chemical Abstracts System</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCB	Denominação Comum Brasileira
DPR%	Desvio padrão relativo percentual
e.p.m.	Erro padrão de média
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GL	Graus de liberdade
NCM	Nomenclatura Comum Mercosul
r	Coefficiente de correlação de Pearson
UV	Ultravioleta
$\lambda$	Comprimento de onda

## 1. INTRODUÇÃO

Os primeiros investigadores a reconhecer o potencial clínico dos microrganismos como agentes terapêuticos foram Pasteur e Joubert, em 1877.

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas por várias espécies de microrganismos (bactérias, fungos, actinomicetos) que impedem o crescimento de outros microrganismos e podem eventualmente destruí-los. Contudo, frequentemente na prática o termo antibiótico é mais abrangente, isto é, inclui fármacos antibacterianos sintéticos, sulfonamidas, quinolonas, que não são produzidas por microrganismos (GOODMAN e GILMAN, 2003).

O uso inadequado de agentes antimicrobianos, como tratamento de infecções não tratáveis, posologia inadequada, falta de informação bacteriológica adequada, gera microrganismos resistentes, que são mais difíceis de serem tratados posteriormente.

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídico isolado em 1956, obtido por *Streptomyces orientalis*. Foi introduzido no mercado em 1958, produzido pelo Laboratório Lilly, Estados Unidos da América. Atualmente tem sido utilizado principalmente no tratamento contra estafilococos resistentes à meticilina. Tem peso molecular aproximadamente de 1.500 Da (VILA et al., 2007).

A estrutura química da vancomicina está representada na Figura 1.



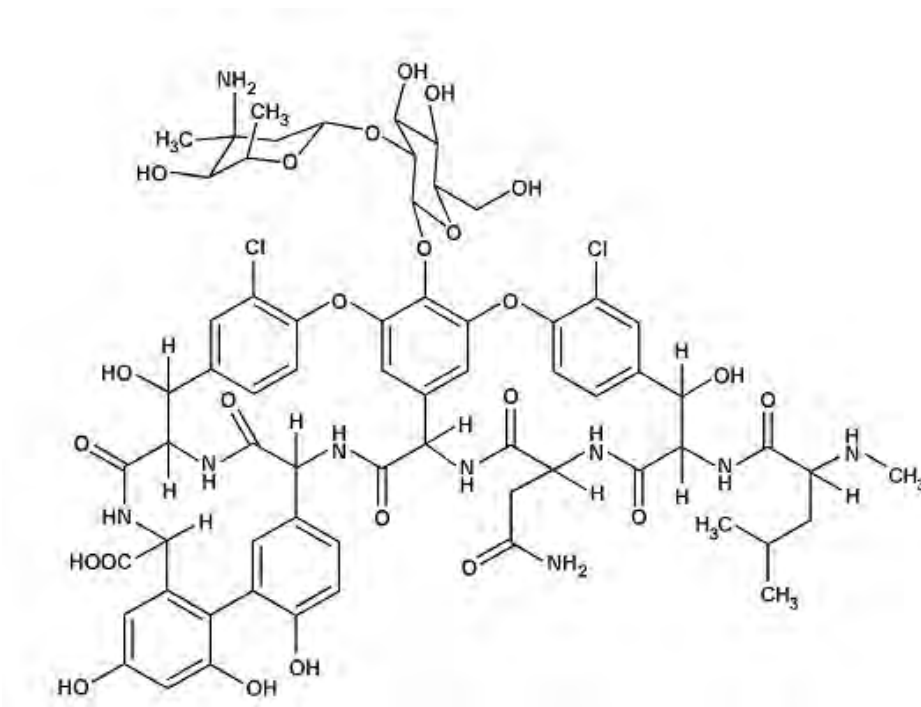


Figura 1 - Estrutura química da vancomicina.

Fonte: VILA et al., 2007.

A teicoplanina é um antibiótico glicopeptídico, inibidor da síntese da parede celular, descoberto em 1978 e introduzido no mercado em 1991, no Reino Unido. Atualmente, tem sido amplamente utilizado em tratamentos contra bactérias Gram-positivas (MATTHEWS et al., 2007).

É um antibiótico produzido pelo *Actinoplanes teichomyetius*. Embora não tenha sido aprovada pela FDA para uso nos EUA, a teicoplanina está disponível na Europa (GOODMAN e GILMAN, 2003).

A estrutura química da teicoplanina consiste numa mistura de cinco componentes maiores que são designados A2-1, A2-2, A2-3, A2-4 e A2-5. Todos os componentes da teicoplanina são análogos glicopeptídeos com peso molecular que variam de 1564,3 a 1907,7 (BERNAREGGI et al., 1992). Sua estrutura está representada na Figura 2.

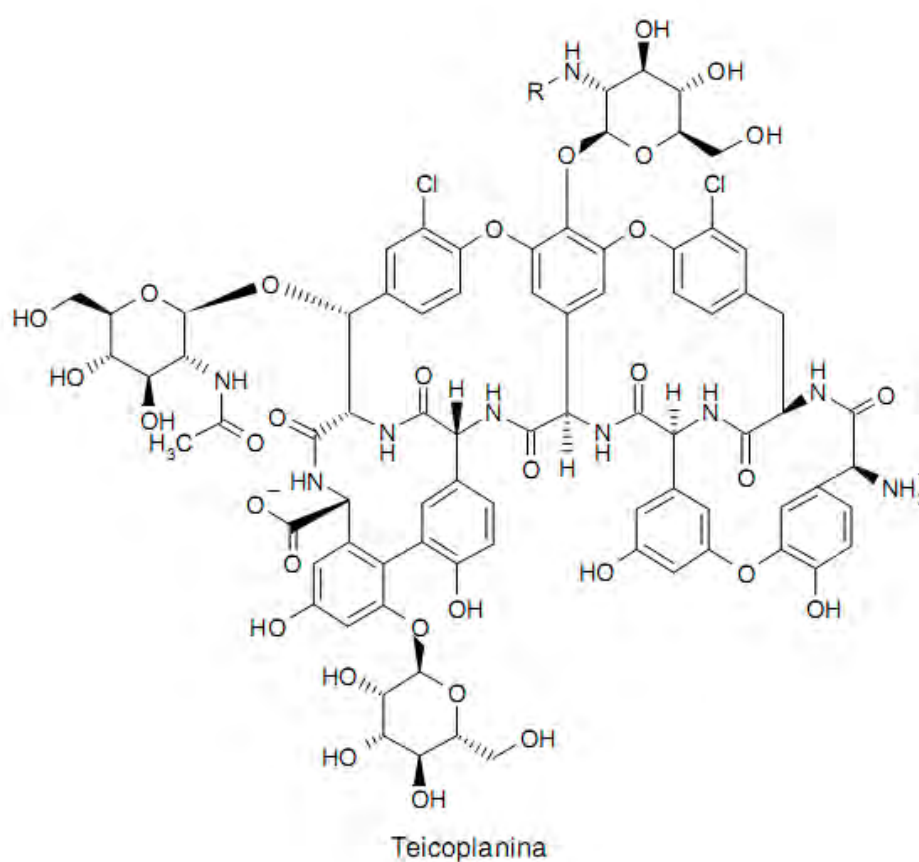


Figura 2 - Estrutura química da teicoplanina.

Fonte: GARCIA QUETGLAS et al., 2003.

A teicoplanina é comercializada no Brasil na forma de pó liofilizado, que deve ser reconstituído antes da administração. O medicamento referência é o Targocid®, do Laboratório Sanofi-Aventis, que tem duas apresentações, de 66 mg/mL e 133,33 mg/mL. A teicoplanina também é comercializada pelo laboratório Cristália, sob o nome de Bactomax®, também apresentado na forma pó liofilizado, nas concentrações de 200 e 400 mg.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A vancomicina foi lançada comercialmente por causa de sua eficácia contra estafilococos penicilina-resistentes, mas devido à sua alta toxicidade não foi o fármaco de primeira escolha. Com a disseminação do *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (MRSA), a vancomicina voltou a ser usada e se tornou o fármaco de escolha para o tratamento destas infecções em pacientes hospitalizados e em estado grave (SILVA, 2006).

A utilização profilática de glicopeptídeos em pacientes pediátricos com alto risco da infecção por MRSA submetidos à cirurgia cardíaca demonstrou-se segura e eficaz, sendo a teicoplanina o fármaco de escolha, por conseguir manter o nível de concentração sérica durante todo o período de tratamento da maioria dos pacientes que foram submetidos ao estudo (SHIME et al., 2007).

*Staphylococcus* coagulase-positiva é um importante patógeno encontrado na pele e mucosa dos seres humanos e animais. O aumento das infecções causadas por cepas resistentes à oxaciclina, principalmente em hospitais, tem requerido tratamento intravenoso de glicopeptídeos, como vancomicina e teicoplanina. Um estudo em três hospitais de São José dos Campos, mostrou que as cepas isoladas eram sensíveis à vancomicina e à teicoplanina. Os resultados demonstraram a importância do uso adequado de antimicrobianos e do controle de microrganismos resistentes (BERNARDES et al., 2004).

Há alguns anos foi descoberta uma cepa de *S. aureus* intermediário-resistente a glicopeptídeo (GISA). Foi isolado de pacientes que tiveram prolongado tratamento com antibióticos glicopeptídeos. A resistência é

resultado de múltiplas mutações e/ou alterações no gene de expressão (MCCALLUM et al., 2006).

O aparecimento do *S. aureus* intermediário-resistente a glicopeptídeos (BISCHOFF et al., 2001) e agora o aparecimento do total resistente, demonstrou a importância de manter um antibiótico eficaz para o tratamento de infecções críticas causadas por bactérias Gram-positivas. Algumas cepas de *S. aureus* demonstram baixa suscetibilidade à teicoplanina, mas ainda mantêm suscetibilidade à vancomicina (WILSON et al., 2006).

Na literatura foram encontrados trabalhos que evidenciam o aumento progressivo na resistência à vancomicina nas culturas clínicas positivas para *Enterococcus* spp no ambiente hospitalar, o que evidencia a necessidade de medidas de controle mais efetivas para deter a disseminação de enterococos resistentes a vancomicina (MTYNARCZYK et al., 2007; FURTADO et al., 2005).

Outro estudo realizado por Chan e colaboradores em 2008, relatou a alta prevalência de enterococos resistentes à vancomicina, especialmente os que apresentam fenótipo VAN A. Estes enterococos foram isolados de aves pertencentes a granjas na Malásia. Assim sendo, medidas devem ser tomadas para conter a disseminação deste microrganismo em granjas, pois as aves contaminadas infelizmente podem ser utilizadas como alimentos.

Infecções de patógenos multi-resistente a fármacos são uma das maiores causas de internações de pacientes. Nesses últimos anos, vários autores documentaram que a probabilidade de sobrevivência de pacientes com sérias infecções havia decaído devido à terapia inadequada. Os antibióticos glicopeptídicos são uma efetiva arma contra infecções bacterianas causadas

por bactérias Gram-positivas multirresistentes, e também é mais acessível economicamente comparado à linezolida e à daptamicina (PEA et al., 2006; SILVEIRA et al., 2006; GARCIA QUETGLAS et al., 2003).

### **2.1. Mecanismo de ação**

Os antibióticos exercem sua ação antimicrobiana e tóxica pela inibição de importantes processos biológicos. A vancomicina pertence ao grupo de antibióticos inibidores da síntese de mucopeptídeos da parede celular, demonstram pouca toxicidade e são amplamente utilizados (KOROLKOVAS et al., 1982).

A vancomicina inibe a síntese e acoplamento dos polímeros de peptidoglicano da parede celular das bactérias, pois forma um complexo com o precursor D-alanil-D-alanina. Esse precursor se encaixa na molécula da vancomicina, evitando deste modo, sua ligação ao terminal do peptidoglicano, que é o alvo das enzimas transglicolase e transpeptidase, ou seja, ela inibe a incorporação de aminoácidos aos glicopeptídeos integrantes da parede celular das bactérias Gram-positivas. Além disso, a vancomicina pode alterar não só a síntese de RNA como também a permeabilidade da membrana citoplasmática da bactéria. Esses múltiplos mecanismos de ação da vancomicina provavelmente contribuem para baixa frequência de desenvolvimento de resistência (SILVA, 2006).

O mecanismo de ação dos antibióticos que interferem na síntese da parede bacteriana pode ser observado na Figura 3.

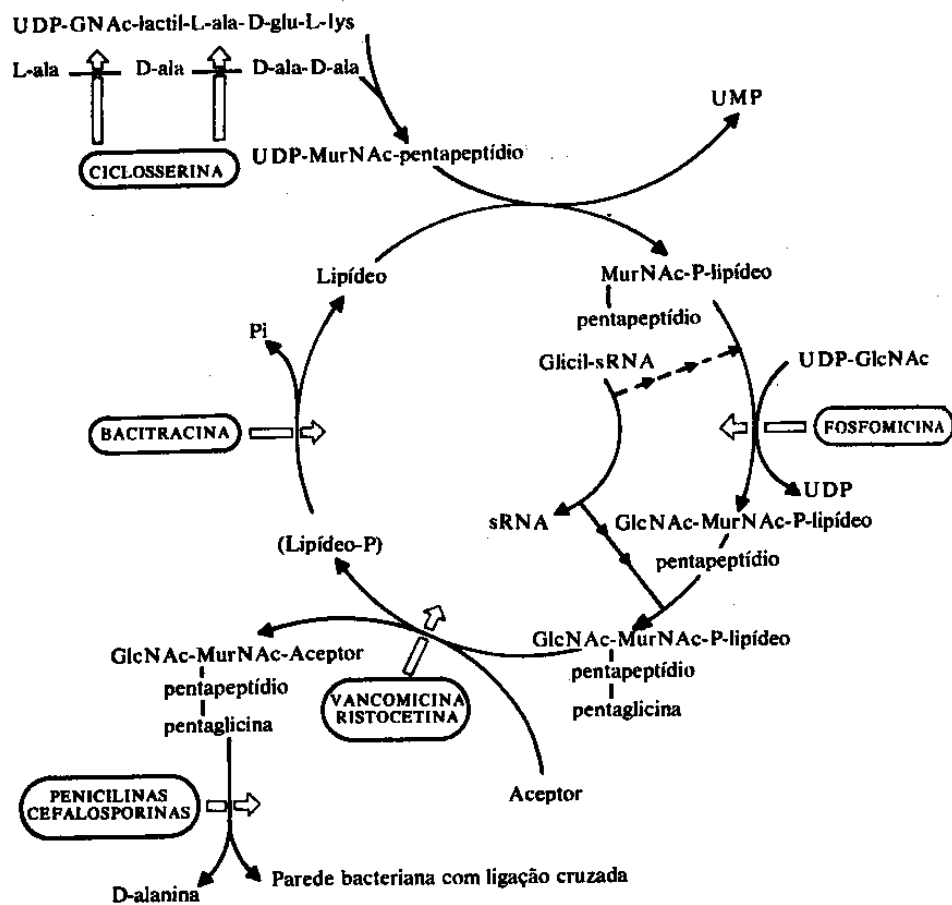


Figura 3 - Local de ação dos antibióticos que interferem na síntese da parede celular bacteriana.

Fonte: KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1982.

A teicoplanina possui mecanismo de ação semelhante à vancomicina.

## **2.2. Características farmacocinéticas**

A teicoplanina e a vancomicina são antibióticos glicopeptídeos, muito semelhantes estruturalmente e com características farmacocinéticas também muito semelhantes, apresentando algumas diferenças, entre elas, a vantagem da teicoplanina ser administrada por via intramuscular (GOODMAN e GILMAN, 2003).

Os antibióticos glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina, foram comparados por Portolés e colaboradores, em 2006. A teicoplanina apresenta menor toxicidade, mas com relação a custos, a terapia com teicoplanina é economicamente mais dispendiosa do que com vancomicina.

Barbot e colaboradores, em 2003, compararam o comportamento farmacocinético e farmacodinâmico da teicoplanina administrada por via intravenosa e subcutânea em pacientes que estavam na unidade de tratamento intensivo. Algumas diferenças no comportamento do fármaco nas duas formas de administração foram observadas, entre elas o pico de absorção que ocorreu após 30 minutos na administração intravenosa contra 7 horas na subcutânea. Mesmo com essas diferenças, os pesquisadores puderam concluir que a administração subcutânea foi bem tolerada, e apresentou a mesma eficácia do tratamento intravenoso. Cabe salientar que outros estudos devem ser feitos para confirmar a eficácia e segurança da terapia subcutânea em pacientes com infecções graves.

Foi constatado que a teicoplanina é comparável à vancomicina quanto à eficácia, à exceção de fracassos com baixas doses utilizadas com infecções graves como a endocardite (GOODMAN e GILMAN, 2003).



A vancomicina não é absorvida pelo intestino, sendo administrada somente por via oral no tratamento de infecções gastrintestinais por *Clostridium difficile*. Para uso parenteral, é administrada por via intravenosa, possui ampla distribuição, com meia-vida plasmática de cerca de 8 horas; com função renal normal, a eliminação ocorre quase que totalmente por filtração glomerular na urina, de modo que o fármaco pode se acumular se houver comprometimento da função renal. Este antibiótico se liga a proteínas plasmáticas na porcentagem de 10 a 55% (RANG et al., 2001).

A teicoplanina pode ser administrada com segurança através de injeção intramuscular e liga-se estreitamente às proteínas plasmáticas (90-95%). Este antibiótico tem meia-vida de eliminação sérica extremamente longa (de até 100 horas em pacientes com função renal normal). A dose de teicoplanina para adultos é de 6-30 mg/kg/dia, sendo as doses mais elevadas reservadas ao tratamento de infecções estafilocócicas graves. É possível administrar uma dose única ao dia no tratamento da maioria das infecções, devido à meia vida de eliminação sérica prolongada do fármaco (GOODMAN e GILMAN, 2003).

Rouveix e colaboradores, em 2004, concluíram que a dose posológica da teicoplanina de 12 mg/kg, administrada em dias alternados, é uma alternativa viável na substituição da terapia 6 mg/kg por dia. Esse regime terapêutico é interessante, pois garante uma melhor qualidade de vida ao paciente e uma maior adesão ao tratamento. Outro estudo relacionado ao regime terapêutico foi efetuado por Sato e colaboradores em 2006, no qual analisaram 48 pacientes com pneumonia causada por MRSA, e concluíram que a melhor terapia foi alcançada em três dias de tratamento, começando com uma dose de 800 mg e nos dois dias subsequentes de 400 mg.

A biodisponibilidade da teicoplanina intramuscular é de 90-92%, e sua concentração máxima é alcançada em 2 a 4 horas após a administração. Sua eliminação renal ocorre por filtração glomerular, cerca de 20 a 30% é excretada inalterada nas primeiras 24 horas e alcançada a 80% em 16 dias (GARCIA QUETGLAS et al., 2003).

### **2.3. Usos clínicos**

A teicoplanina tem sido usada no tratamento de uma ampla variedade de infecções, incluindo osteomielite e endocardite, causadas por estafilococos. Está entre os fármacos mais ativos contra os enterococos. A experiência limitada indica que teicoplanina é eficaz contra infecções enterocócicas graves, embora seja apenas bacteriostática. Deve ser combinada com gentamicina para se obter efeito bactericida no tratamento da endocardite enterocócica (GOODMAN e GILMAN, 2003).

*Staphylococcus aureus* é um dos causadores da meningite bacteriana, que é associada a 27-35% da taxa de mortalidade. O MRSA (*S. aureus* meticilina resistente) é o maior causador das infecções que acometem o sistema nervoso central, e tem apresentado resultados positivos de cura quando tratados com teicoplanina intravenosa. Os resultados deste estudo sugeriram que a teicoplanina é mais eficiente do que a vancomicina em tratamentos contra meningites MRSA (SIPAHI et al., 2005).

Nos procedimentos cirúrgicos oculares, complicações podem ocorrer durante e depois da cirurgia, causando infecções oculares. A cirurgia com maior índice de infecção é a de retirada de catarata. Em 76% a 90% dos casos

isolados de bactérias Gram-positivas, o patógeno isolado foi *Staphylococcus* coagulase-negativa, nos quais a teicoplanina foi o antibiótico que mostrou resultados positivos para esse tratamento (ÖZKAN et al., 2005).

A osteomelite crônica é ainda um grave problema em termos de terapia e infecção resistente. O tratamento é realizado em quatro a seis semanas. O principal patógeno causador da osteomelite é o *Staphylococcus aureus*, para o qual a teicoplanina é um antibiótico eficiente contra esta bactéria Gram-positiva. Estudos sobre incluir o antibiótico em polímeros sintéticos para implante nos defeitos ósseos têm sido satisfatórios (YENICE et al., 2003).

Em modelos animais, a teicoplanina demonstrou capacidade para penetrar em tecido músculo-esquelético, o que permite um tratamento em infecções ósseas (MATTHEWS et al., 2007).

Gómez-Garcés e colaboradores, em 2007, evidenciaram que os únicos antibióticos que demonstraram eficácia contra *Corynebacterium* similar à linezolid foram os antibióticos glicopeptídicos.

Em cirurgias vasculares, infecções dos enxertos protéticos são preocupantes. A mortalidade nestas cirurgias é de 20% e as amputações 57%, sendo os microrganismos causadores destas infecções, principalmente o *S. aureus* e o *S. epidermidis*. Estratégias importantes para a prevenção de infecções são assepsia e administração de antibióticos sistêmicos, como teicoplanina, vancomicina e cefazolina. A teicoplanina possui um espectro antimicrobiano semelhante à vancomicina, porém possui uma meia-vida prolongada e menos efeitos tóxicos, sendo bem tolerada após administração intra-muscular, e sua prolongada meia-vida garante apenas uma aplicação ao dia. Os resultados deste estudo demonstraram que o antibiótico mais indicado

para a prevenção de infecções de prótese vascular é a teicoplanina (ATAHAN et al., 2007).

Ghiselli e colaboradores, em 2008, testaram a eficácia tópica da teicoplanina por meio de modelo animal. Concluíram que um gel hidrocélular umedecido com teicoplanina foi capaz de inibir o crescimento bacteriano e também acelerou a cicatrização, o que evidenciou a possibilidade de utilizar teicoplanina para tratamento de ferimentos infectados.

#### **2.4. Interações**

O uso concomitante da vancomicina com aminoglicosídeos, anfotericina B, bumetanida, carmustina, cisplatina, ciclosporina e furosemida, pode aumentar os riscos de ototoxicidade e/ou nefrotoxicidade e com anti-histamínicos, fenotiazínicos, buclizina, ciclizina, podem mascarar os efeitos da ototoxicidade, com zumbido, tontura, vertigem. A vancomicina aumenta a toxicidade de ciclosporina e tacrolimus (SILVA, 2006).

#### **2.5. Reações adversas**

Os efeitos indesejáveis do tratamento com a vancomicina são febre, erupções cutâneas, flebite local na região da injeção. Podem ocorrer ototoxicidade e nefrotoxicidade e, em certas ocasiões, são observadas reações de hipersensibilidade (RANG et al., 2001). A ototoxicidade ocorre em 2 a 5,5% dos pacientes, mais frequentemente quando a concentração sanguínea excede 80 mg/L, já a nefrotoxicidade ocorre em 5 a 7 % dos pacientes, normalmente quando a concentração sanguínea excede 10 mg/L (VILA, et al., 2007).

Machado e colaboradores, em 2007, confirmaram o risco potencial da vancomicina em altas concentrações causar nefrotoxicidade e ototoxicidade. Concluíram que níveis plasmáticos abaixo de 10 µg/mL garantem eficácia terapêutica e nenhum risco de causar nefrotoxicidade; estes níveis devem ser monitorados durante todo o tratamento pois pode haver necessidade de ajuste de dose.

Em relação à teicoplanina, o efeito colateral mais pronunciado é o exantema cutâneo. Normalmente aparece quando são administradas doses elevadas do fármaco. Outros efeitos colaterais menos pronunciados são: hipersensibilidade, febre medicamentosa, neutropenia e ototoxicidade, sendo o último o mais raro (GOODMAN e GILMAN, 2003). Também podem ocorrer broncoespasmos, distúrbios gastrintestinais e dores de cabeça (MARTINDALE, 2006).

Alguns efeitos adversos foram observados em pacientes que estavam utilizando teicoplanina subcutânea, cerca de 15% dos pacientes apresentaram efeitos como eritema, dor, prurido e nódulo no local da administração, cabe salientar que estes efeitos apareceram na primeira aplicação, não se repetindo nas subsequentes (BARBOT et al., 2003).

Hahn-Ast e colaboradores, em 2008, compararam à eficácia e toxicidade da teicoplanina e vancomicina em pacientes com neutropenia e febre persistente. Foi concluído que a vancomicina é mais nefrotóxica do que a teicoplanina; mesmo quando a segunda é administrada em conjunto com anfotericina B, não foi detectado diferenças com relação à eficácia.

A teicoplanina é um fármaco relativamente novo no mercado nacional, cujo uso é exclusivamente hospitalar. Há, na literatura, estudos com relação à

atividade antimicrobiana, farmacocinética, farmacodinâmica, mas poucos com relação estrutura-atividade, interações medicamentosas e principalmente sobre desenvolvimento de metodologia analítica para este fármaco. Este fato destaca a importância da realização de estudos para aperfeiçoar sua análise na indústria farmacêutica e garantir assim, a qualidade do produto que está disponível no mercado.

Há uma metodologia de análise descrita na farmacopéia japonesa para doseamento de teicoplanina matéria-prima, que se baseia em método microbiológico por difusão em ágar. Esta técnica não é a mais indicada para ser utilizada na indústria farmacêutica, pois é bastante demorada, sendo o resultado final obtido após três dias, o que pode gerar atrasos na produção.

## **2.6. Validação**

De acordo com a Resolução da ANVISA nº 899, de 29 de maio de 2003, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise.

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

Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras

(fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais.

**Linearidade:** É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser  $= 0,99$ .

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

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

- ✓ Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações,

baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;

- ✓ Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.
- ✓ Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%). O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

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



método pode ser medida através da adição de quantidades conhecidas de padrão.

**Robustez:** A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

Os testes quantitativos para determinação de princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas exigem os testes de especificidade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003a).

Apesar da comprovada eficácia e segurança nos tratamentos com teicoplanina, este fármaco possui somente monografia oficial descrita na Farmacopéia Japonesa, a qual descreve o método microbiológico por difusão em ágar. Assim sendo, este projeto objetiva o desenvolvimento e a validação de métodos alternativos para a quantificação de teicoplanina sob a forma liofilizada injetável.

### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e a validação de metodologia de análise para a teicoplanina. Os objetivos específicos são:

1. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de espectrofotometria na região ultravioleta para teicoplanina injetável.
2. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise por cromatografia líquida de alta eficiência para teicoplanina injetável.
3. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise microbiológica por método turbidimétrico da teicoplanina injetável.

## 4. DESCRIÇÃO

Nome: Teicoplanina

Nomes comerciais no Brasil: Targocid®, Bactomax®, Kiron®, Teicon®, Teiconin®.

DCB: 08349

NCM: 294190.00

CAS: 61036-62-2

Característica: Pó branco amorfo

Categoria: Antibacteriano

Fórmula química:  $C_{89}H_{99}Cl_2N_9O_{33}$

Peso molecular: 1893,71

Ponto de fusão: 260°C (The Merck Index, 2006)

### 4.1. Substância química de referência

Foi utilizada teicoplanina, gentilmente cedida pelo Laboratório Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, Ltda. (Itapira, Brasil).

### 4.2. Forma farmacêutica

Foram utilizados frascos-ampola contendo pó liofilizado, gentilmente doados pelo Laboratório Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, contendo 200 mg (teor rotulado), sob o nome comercial de Bactomax® e identificado pelo lote de número 07031896.

## 5. ANÁLISE QUANTITATIVA

### 5.1. Material

#### 5.1.1. Equipamentos

- ✓ Balança analítica (Bel Engineering) (Monza, Itália).
- ✓ Banho de ultrassom (Unique, Ultrasonic Cleaner) (Indaiatuba, Brasil).
- ✓ Coluna Symmetry® C<sub>18</sub>, 5 µm, 100 Å, 3,9 mm x 250 mm, 4,6 mm φ (Franklin, Estados Unidos da America).
- ✓ Espectrofotômetro (Hewlett Packard, KAYAK XA) (Califórnia, Estados Unidos da América).
- ✓ Pipetador automático capacidade 100-1000 µL (Digipet, micropipette-high precisin).
- ✓ Sistema de cromatografia líquida (HPLC) (Waters 2487, dual λ absorbance detector; Waters 1525, binary HPLC pump) (Franklin, Estados Unidos da America).
- ✓ Sistema de purificação de água (MILLIPORE direct-Q<sub>3</sub>) (Molsheim, França).

#### 5.1.2. Matérias-primas, reagentes e solventes

- ✓ Água deionizada Milli Q
- ✓ Álcool metílico (J.T. Baker, HPLC)
- ✓ Acetonitrila (J.T. Baker, HPLC)
- ✓ Ágar Casoy (Difco)

## **5.2. Espectrofotometria na região ultravioleta**

### **5.2.1. Considerações gerais**

A espectrofotometria na região ultravioleta é usada principalmente para identificação de compostos orgânicos, incluindo fármacos. Entretanto, este método é também largamente utilizado para doseamento de fármacos (KOROLKOVAS, 1988).

O fundamento deste método consiste em comparar absorvância produzida pela solução da amostra com a absorvância de uma solução de referência (KOROLKOVAS, 1988).

### **5.2.2. Método**

O espectro na região de ultravioleta foi obtido utilizando-se equipamento Espectrofotômetro (Hewlett Packard-KAYAK XA) e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A leitura foi realizada entre 200 e 400 nm. As soluções foram preparadas com a substância de referência de teicoplanina, utilizando como solvente a água purificada.

O espectro de absorção de teicoplanina substância química de referência na região de ultravioleta está representado na Figura 4.

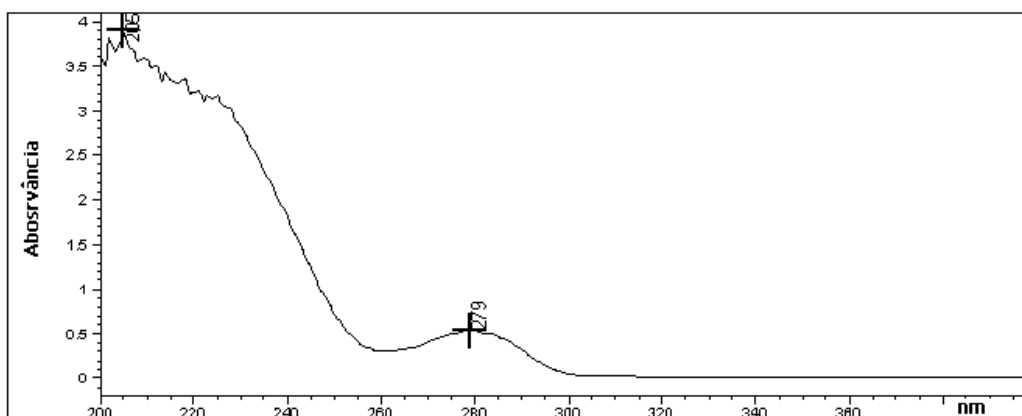


Figura 4 - Espectro de absorção na região ultravioleta de teicoplanina em solução aquosa 90,0  $\mu\text{g/mL}$ .

### 5.2.3. Realização da curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi realizada com o objetivo de determinar a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região de ultravioleta obedece à linearidade. A curva foi construída com 16 pontos com faixa de concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  a 300  $\mu\text{g/mL}$ .

Foram pesados 50,0 mg de substância de referência e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado com água purificada, obtendo-se assim uma solução de teicoplanina de 500,0  $\mu\text{g/mL}$ .

A partir dessa solução estoque foram transferidas alíquotas para a obtenção da curva analítica com 16 pontos de concentrações crescentes. Os volumes dos balões volumétricos foram completados com água purificada para a obtenção das soluções com concentrações de 1,0 a 300,0  $\mu\text{g/mL}$  de teicoplanina, que estão representadas na Tabela 1.

O espectro de absorção (Figura 4) permitiu definir o comprimento de onda no qual foram realizadas as leituras de absorvância das soluções.

Tabela 1 - Preparo das soluções utilizadas na construção da curva de Ringbom de teicoplanina.

<b>Solução</b>	<b>Volume (estoque) mL</b>	<b>Balão volumétrico (mL)</b>	<b>Conc. Final (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
1	0,1	50	1,0
2	1,0	50	10,0
3	2,0	50	20,0
4	4,0	50	40,0
5	3,0	25	60,0
6	4,0	25	80,0
7	5,0	25	100,0
8	6,0	25	120,0
9	7,0	25	140,0
10	8,0	25	160,0
11	9,0	25	180,0
12	4,0	10	200,0
13	4,4	10	220,0
14	4,8	10	240,0
15	5,4	10	270,0
16	6,0	10	300,0

A curva de Ringbom, apresentada na Figura 5, foi obtida utilizando-se logaritmo das concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) versus absorvância ( $100-T\%$ ).

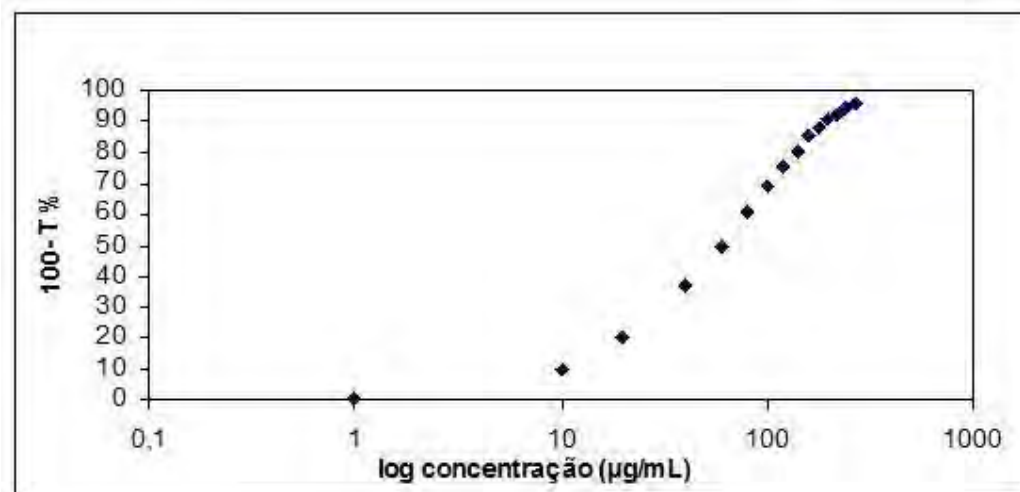


Figura 5 - Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta para solução de teicoplanina substância de referência de 1,0 à 300,0  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 5.2.4. Obtenção da curva analítica

A faixa de concentração que apresentou linearidade foi de 60  $\mu\text{g/mL}$  a 120  $\mu\text{g/mL}$ , sendo assim essa a faixa de trabalho.

Para a realização da curva analítica foram pesados analiticamente, 20,0 mg de teicoplanina substância de referência, previamente dessecados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água purificada, para obtenção de solução de teicoplanina 200,0  $\mu\text{g/mL}$ . Desta solução, foram transferidas alíquotas de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5 mL para balões volumétricos de 10 mL completando o volume com água, obtendo-se concentrações de 60,0; 70,0; 80,0; 90,0; 100,0 e 110,0  $\mu\text{g/mL}$  de teicoplanina substância de referência. Estas soluções foram preparadas em triplicatas.



A curva analítica foi construída, diluindo concentrações preparadas com a substância de referência, utilizando como solvente água purificada, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Preparo da curva analítica de teicoplanina através de espectrofotometria no ultravioleta a 279 nm.

<b>Solução</b>	<b>Vol. de teicoplanina 200 µg/mL (mL)</b>	<b>Vol. de água (mL)</b>	<b>Concentração final (µg/mL)</b>
1	3,0	7,0	60,0
2	3,5	6,5	70,0
3	4,0	6,0	80,0
4	4,5	5,5	90,0
5	5,0	5,0	100,0
6	5,5	4,5	110,0

Os resultados referentes às absorvâncias, obtidos para a curva analítica, estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de teicoplanina através de espectrofotometria no ultravioleta a 279 nm.

<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Abs*</b>	<b>Abs média <math>\pm</math> e.p.m.</b>	<b>DPR%</b>
	0,3176		
60,0	0,3171	0,3164 $\pm$ 0,000928	0,508
	0,3146		
	0,3734		
70,0	0,3737	0,3730 $\pm$ 0,000524	0,243
	0,3720		
	0,4386		
80,0	0,4362	0,4363 $\pm$ 0,001357	0,539
	0,4339		
	0,4923		
90,0	0,4910	0,4899 $\pm$ 0,001757	0,621
	0,4865		
	0,5362		
100,0	0,5491	0,5424 $\pm$ 0,003732	1,192
	0,5419		
	0,6045		
110,0	0,5982	0,6010 $\pm$ 0,001859	0,536
	0,6002		

e.p.m.- erro padrão de média; DPR % - desvio padrão relativo percentual

\*Abs = absorvância

A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de regressão das soluções de teicoplanina em concentrações de 60,0 à 110,0 µg/mL pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta à 279 nm estão representados na Figura 6.

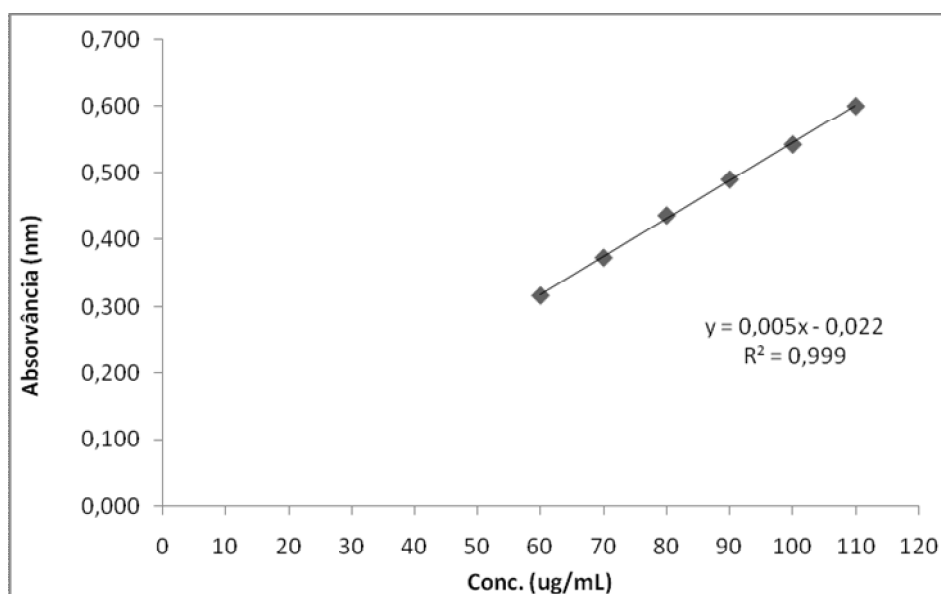


Figura 6 - Representação gráfica da curva analítica da solução de teicoplanina pelo método espectrofotométrico na região ultravioleta a 279 nm.

#### 5.2.5. Análise estatística

As absorvâncias utilizadas na determinação da curva analítica foram avaliadas estatisticamente pela análise de variância (ANOVA).

Os parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) das absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica da teicoplanina através do método espectrofotométrico na região ultravioleta a 279 nm

<b>Fontes de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Variância</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>ENTRE</b>	5	0,16889	0,033778	2880,988*	3,11
<b>regressão linear</b>	1	0,168774	0,168774	14395,04*	4,75
<b>desvio de linearidade</b>	4	0,000116	2,9E-05	2,475455	3,26
<b>RESÍDUO</b>	12	0,000141	1,17E-05	-	-
<b>TOTAL</b>	17	0,169031	-	-	-

\*significativo  $P < 0,05$

Os parâmetros analíticos utilizados na determinação da teicoplanina através do método espectrofotométrico encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros analíticos utilizados na determinação de teicoplanina através de método espectrofotométrico na região ultravioleta a 279 nm

<b>parâmetros</b>	<b>resultados</b>
$\lambda$ máximo (nm)	279 nm
Limites da lei de Beer ( $\mu\text{g/mL}$ )	60,0 à 110,0
Equação: $y = a + bx$	$y = 0,005x - 0,002$
a	0,005
b	0,022
r (coeficiente de correlação)	0,999
n	6

#### **5.2.6. Determinação de teicoplanina no pó liofilizado**

##### **5.2.6.1. Preparo da amostra**

Após a realização de um “pool” com a quantidade de medicamento presente em quatro frascos, uma quantidade do pó liofilizado, foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água purificada para a obtenção de solução de teicoplanina com concentração teórica de 500,0  $\mu\text{g/mL}$ . Desta solução, foi transferida alíquota de 6,0 mL para balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com água purificada, para obtenção de solução de 60,0  $\mu\text{g/mL}$ .

##### **5.2.6.2. Cálculo**

A concentração da solução amostra foi obtida pela Equação 1.

$$Ca = Aa.Csr/Asr \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

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

Aa = absorvância da amostra

Csr = concentração da substância referência

Asr = absorvância da substância referência

O teor percentual da teicoplanina nas amostras foi calculado pela Equação 2.

$$Ca\% = Ca.100/Ct \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

Ca = concentração de teicoplanina na amostra (mg)

Ct = concentração de teicoplanina teórica na amostra (mg)

Os valores experimentais da determinação da teicoplanina em pó liofilizado encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Teor de teicoplanina em 200 mg de pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região ultravioleta a 279 nm.

Repetições	absorvâncias	quantidade encontrada (mg)	Teor (%)	média ± e.p.m.	DPR %
1	0,31841	200,26	100,13	0,3168 ± 0,0012	0,64
	0,31747				
	0,31449				
2	0,29829	192,04	96,02	0,3037 ± 0,0047	2,66
	0,29971				
	0,31298				
3	0,31315	192,40	96,20	0,3038 ± 0,0047	2,69
	0,29782				
	0,30051				

e.p.m.- erro padrão de média; DPR % - desvio padrão relativo percentual

### 5.2.7. Validação do método

A validação de um método analítico consiste na avaliação de alguns parâmetros, tais como linearidade, precisão, seletividade e exatidão (ICH, 1996; USP, 2008).

Através de soluções preparadas utilizando o pó de teicoplanina previamente pesado, nas concentrações de 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 100,0 e

110,0  $\mu\text{g/mL}$ , em água purificada, o método foi validado nesta faixa em questão.

#### **5.2.7.1. Precisão**

A precisão de um método é obtida pelo grau de concordância entre os valores de uma série repetida de ensaios analíticos efetuados em uma amostra homogênea.

A precisão do método foi avaliada pelo coeficiente de variação, utilizando teicoplanina pó liofilizado. O ensaio foi realizado em três diferentes dias e em triplicata.

Para o ensaio de precisão, foi preparada uma solução de teicoplanina, em água purificada, com concentração teórica de 500,0  $\mu\text{g/mL}$ . Desta solução, foram transferidas alíquotas de 8,0 mL para balão volumétrico de 50 mL e 4,5 e 5,5 mL para balões volumétricos de 25 mL completando o volume com água purificada, para obtenção de soluções de concentrações de 80,0; 90,0 e 110,0  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 7).



Tabela 7 - Preparo das soluções de teicoplanina em concentração de 80,0 a 110,0 µg/mL, para o ensaio de precisão, pelo método de espectrofotometria na região UV a 279 nm.

<b>Solução</b>	<b>vol. de teicoplanina 500µg/mL (mL)</b>	<b>vol. de água (mL)</b>	<b>concentração final (µg/mL)</b>
1	8,0	42,0	80,0
2	4,5	20,5	90,0
3	5,5	19,5	110,0

Os valores de absorvância encontrados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores experimentais da teicoplanina pó liofilizado, obtidos por espectrofotometria na região UV.

<b>concentração (µg/mL)</b>	<b>absorvância* ± e.p.m.</b>	<b>coeficiente de variação (%)</b>
80,0	0,410 ± 0,00356	2,60
90,0	0,460 ± 0,00436	2,84
110,0	0,561 ± 0,00563	3,01

\* cada valor é a média de nove determinações  
± e.p.m. = Erro padrão de média

### 5.2.7.2. Recuperação

O teste de recuperação é utilizado para testar a exatidão do método. Desta forma, quantidades conhecidas de solução de referência foram adicionadas à amostra.

Para o ensaio de recuperação, foram preparadas duas soluções com concentração teórica de 900  $\mu\text{g/mL}$ , uma com substância de referência de teicoplanina e outra com o pó liofilizado.

Desta solução de referência foi transferido uma alíquota de 1,0 mL e transferido para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se uma solução de referência SR1 de 90,0  $\mu\text{g/mL}$  (em triplicata).

Da solução amostra, foram transferidas alíquotas de 1,0 mL para balões volumétricos de 10 mL, denominados de A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>. Foram adicionados 0,05; 0,1 e 0,15 mL da solução de referência SR1, nos balões R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, respectivamente. Os volumes foram completados com água purificada obtendo-se concentrações de 90,0; 94,5; 99,0 e 103,5  $\mu\text{g/mL}$  de teicoplanina.

O preparo das soluções pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9 - Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de teicoplanina para método de espectrofotometria na região UV a 279 nm.

	<b>Vol. de solução amostra 900,0 µg/mL (mL)</b>	<b>Vol. de solução de referência 900,0 µg/mL (mL)</b>	<b>Volume final (mL)</b>	<b>Concentração teórica (µg/mL)</b>
A	1,0	-	10,0	90,0
R <sub>1</sub>	1,0	0,05	10,0	94,5
R <sub>2</sub>	1,0	0,10	10,0	99,0
R <sub>3</sub>	1,0	0,15	10,0	103,5

#### 5.2.7.2.1. Cálculo de teste de recuperação

A porcentagem de recuperação foi calculada pela equação 3, descrita pela AOAC.

$$R\% = [(C_f - C_u)/C_a].100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

C<sub>f</sub> = Concentração da substância de referência + concentração da amostra

C<sub>u</sub> = Concentração da amostra

C<sub>a</sub> = Concentração da substância de referência adicionada

Os resultados obtidos no teste de recuperação da teicoplanina estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Teste de recuperação de solução de teicoplanina substância de referência adicionada à solução de teicoplanina frasco-ampola pelo método espectrofotométrico na região ultravioleta a 279 nm.

	<b>Conc. adicionada (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Abs</b>	<b>Conc. encontrada (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
R <sub>1</sub>	4,5	0,494	4,63	102,92
R <sub>2</sub>	9,0	0,518	9,14	101,51
R <sub>3</sub>	13,5	0,542	13,52	100,18

### **5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência**

#### **5.3.1. Considerações gerais**

Cromatografia é o processo analítico para separação de substâncias em mistura, com base nas diferentes velocidades de migração dessas substâncias em razão da afinidade relativas por duas fases: a fase móvel e a fase estacionária.

A cromatografia de alta eficiência (CLAE) é um método de cromatografia em coluna que consiste em introduzir um adsorvente em uma coluna que pode ser aberta ou fechada, e constituída de modo a resistir a pressões elevadas, para permitir que a fase móvel seja impelida por pressão através da coluna em alta velocidade (KOROLKOVAS, 1988).

Na literatura foram encontrados trabalhos que evidenciam a determinação de seis componentes do complexo da teicoplanina em fluidos biológicos através de cromatografia líquida de alta eficiência (JOOS e LÜTHY, 1987; HANADA et al., 2005; SHEN et al., 2007). Outro trabalho compara a análise de teicoplanina em fluidos biológicos por CLAE e FPIA (MCCANN et al., 2002).

#### **5.3.2. Método**

Foram utilizados teicoplanina substância de referência e teicoplanina frascos-ampola descritos nos itens 4.1 e 4.2, respectivamente. Todos os solventes utilizados foram de grau analítico CLAE.

Para a padronização do sistema cromatográfico, foi utilizado equipamento descrito no item 6.1; as condições estão apresentadas na Tabela 11.

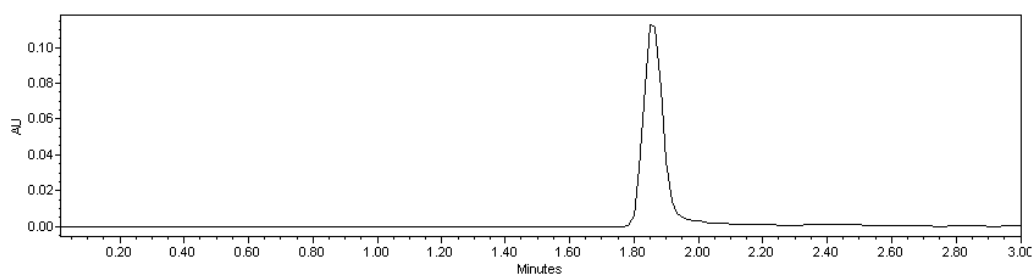
Tabela 11 - Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método por CLAE.

<b>Sistema</b>	<b>Parâmetros</b>
equipamento	CLAE binário1525
fase móvel	metanol : acetonitrila (50:50; V/V)
coluna	Waters C18 (250 mm x 4,6 mm I.D., 5,0 µm tamanho da partícula) (WAT 0544275)
$\lambda$	279 nm
vazão	1,0 mL/min
volume de injeção	10,0 µL
temperatura	20 ± 1°C
tempo de retenção	1,8 min

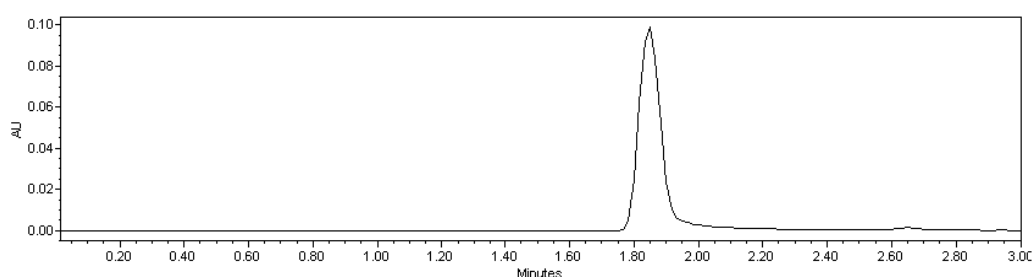
A fase móvel foi filtrada por membrana (0,45 µm), sob vácuo, e degaseificada durante 20 minutos.

Foram preparadas soluções de teicoplanina substância de referência. A primeira diluição foi feita em água e as posteriores em fase móvel, devido à interferência da água no pico de absorção da teicoplanina.

Os cromatogramas obtidos para teicoplanina substância de referência e amostra estão representados na Figura 7.



(A)



(B)

Figura 7 - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de teicoplanina substância de referência (A) e amostra (B) (90 µg/mL).

Condições cromatográficas: fase móvel: metanol : acetonitrila (50 : 50, V/V); coluna: Waters C18 (250,0 mm x 4,6 mm I.D., 5,0 µm tamanho da partícula) (WAT 0544275); vazão: 1,0 mL/min; comprimento de onda 279 nm; tempo de retenção 1,8 minutos.

### 5.3.3. Obtenção da curva analítica

Por meio de testes realizados, a faixa de concentração que apresentou linearidade foi de 70,0 µg/mL a 120,0 µg/mL, sendo, portanto, utilizada esta faixa de trabalho.

A curva analítica foi construída, utilizando concentrações preparadas com a substância de referência nas seguintes concentrações: 70,0; 80,0; 90,0; 100,0; 110,0 e 120,0  $\mu\text{g/mL}$ , sendo a primeira diluição em água e as posteriores diluições em fase móvel (acetonitrila : metanol, 50:50, v/v).

Para construção da curva analítica, foram pesados 50,0 mg de teicoplanina substância de referência, previamente dessecados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água purificada, para obtenção de solução de teicoplanina com concentração teórica de 500,0  $\mu\text{g/mL}$ . Desta solução, foram transferidas alíquotas de 3,5; 4,0; 4,5 e 6,0 mL para balões volumétricos de 25 mL e 2,0; 2,2 mL para balões volumétricos de 10 mL completando o volume com fase móvel (acetonitrila : metanol, 50:50, V/V) para obtenção de soluções de concentrações de 70,0 a 120,0  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 12). Estas soluções foram preparadas em triplicatas.

Tabela 12 - Preparo da curva analítica de teicoplanina em concentração de 70,0 a 120,0  $\mu\text{g/mL}$ , por CLAE.

<b>Solução</b>	<b>vol. de teicoplanina 500<math>\mu\text{g/mL}</math> (mL)</b>	<b>vol. de água (mL)</b>	<b>concentração final (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
1	3,5	21,5	70,0
2	4,0	21,0	80,0
3	4,5	20,5	90,0
4	2,0	8,0	100,0
5	2,2	7,8	110,0
6	6,0	19,0	120,0



Os resultados das medidas das áreas obtidas para a curva analítica estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Áreas absolutas determinadas na obtenção da curva analítica de teicoplanina por CLAE.

<b>concentração</b>	<b>áreas</b>	<b>área média ±</b>	<b>DPR%</b>
<b>(µg/mL)</b>	<b>absolutas</b>	<b>e.p.m.</b>	
70,0	385120,30	386325,00 ± 1598,91	0,72
	384362,00		
	389492,70		
80,0	452154,50	451818,70 ± 535,78	0,21
	452532,00		
	450769,50		
90,0	514226,00	513956,00 ± 157,65	0,05
	513680,00		
	513962,00		
100,0	570092,00	570523,20 ± 1318,37	0,40
	568486,00		
	572991,50		
110,0	630893,00	633024,20 ± 1157,12	0,32
	633308,50		
	634871,00		
120,0	688282,00	690897,70 ± 2147,19	0,54
	689256,00		
	695155,10		

e.p.m.- erro padrão de média; DPR % - desvio padrão relativo percentual

A curva analítica foi construída, utilizando concentrações preparadas com a substância de referência nas seguintes concentrações: 70,0; 80,0; 90,0; 100,0; 110,0 e 120,0  $\mu\text{g/mL}$ , como pode ser observado na Figura 8.

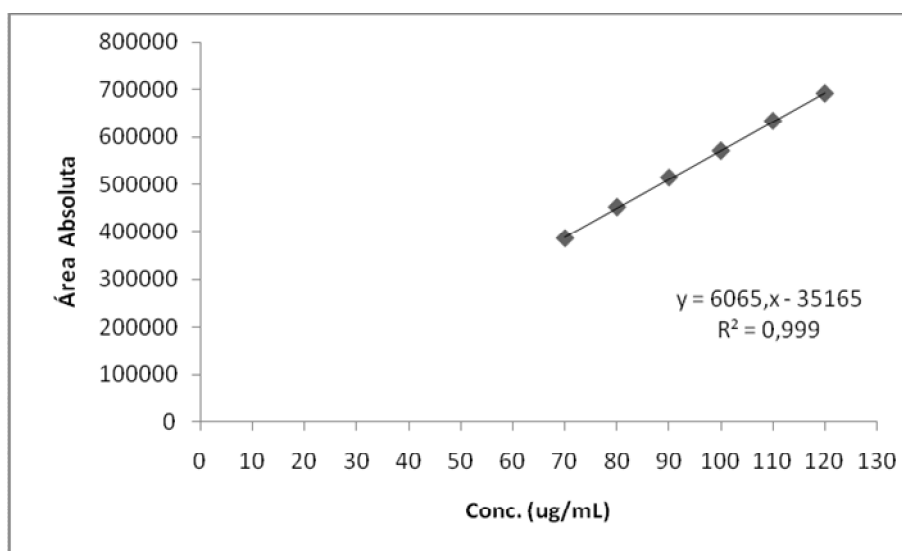


Figura 8 - Representação gráfica da curva analítica da solução de teicoplanina em concentrações de 70,0 a 120,0  $\mu\text{g/mL}$  por CLAE.

#### 5.3.4. Análise estatística

As absorvâncias utilizadas na determinação da curva de analítica foram avaliadas estatisticamente pela análise de variância (ANOVA).

Os parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14 - Análise de variância das áreas determinadas na obtenção da curva analítica de teicoplanina através do método CLAE.

<b>Fontes de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Variância</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>ENTRE</b>	5	$1,96 \times 10^{11}$	$3,91 \times 10^{10}$	5313,61*	3,11
<b>regressão linear</b>	1	$1,95 \times 10^{11}$	$1,95 \times 10^{11}$	26556,65*	4,75
<b>desvio de linearidade</b>	4	$8,39 \times 10^7$	$2,10 \times 10^7$	2,85	3,26
<b>RESÍDUO</b>	12	$8,83 \times 10^7$	$7,36 \times 10^6$	-	-
<b>TOTAL</b>	17	$1,96 \times 10^{11}$	-	-	-

\*significativo  $P < 0,05$

Tabela 15 - Parâmetros analíticos utilizados na determinação de teicoplanina pelo de método CLAE.

<b>parâmetros</b>	<b>resultados</b>
<b>Equação: <math>y = a + bx</math></b>	$y = 6065x - 35165$
<b>a</b>	35165
<b>b</b>	6065
<b>r (coeficiente de correlação)</b>	0,999
<b>n</b>	6

### 5.3.5. Determinação de teicoplanina no pó liofilizado

#### 5.3.5.1. Preparo da amostra

Após a realização de um “pool” com a quantidade de medicamento presente em quatro frascos, uma quantidade do pó liofilizado, foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água purificada para a obtenção de solução de teicoplanina com concentração teórica de 500,0 µg/mL. Desta solução, foi transferida alíquota de 1,4 mL para balão de 10 mL completando o volume com fase móvel (metanol : acetonitrila, 50:50, V/V), para obtenção de solução de 70,0 µg/mL.

#### 5.3.5.2. Cálculo

A concentração da solução amostra foi obtida pela Equação 4.

$$C_a = A_a \cdot C_{sr} / A_{sr} \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

$C_a$  = concentração da amostra (µg/mL)

$A_a$  = área da amostra

$C_{sr}$  = concentração da substância referência

$A_{sr}$  = área da substância referência

O teor percentual da teicoplanina nas amostras foi calculada pela Equação 5.

$$\text{Ca\%} = \text{Ca} \cdot 100 / \text{Ct} \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

Ca = concentração de teicoplanina na amostra (mg)

Ct = concentração de teicoplanina teórica na amostra (mg)

Os valores experimentais obtidos na determinação da teicoplanina em pó liofilizado encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16 – Quantidade determinada para doseamento de pó liofilizado de 200 mg de teicoplanina através de CLAE.

Repetições	áreas absolutas	quantidade		média ± e.p.m.	DPR %
		encontrada (mg)	teor(%)		
	389696,00				
1	387502,00	200,56	100,28	387416 ± 1341,87	0,60
	385050,00				
	374776,00				
2	375138,00	195,44	97,72	377516 ± 2561,80	1,17
	382636,00				
	381047,00				
3	387326,00	198,72	99,36	383870 ± 1840,02	0,83
	383237,00				

e.p.m.- erro padrão de média; DPR % - desvio padrão relativo percentual

### **5.3.6. Validação do método**

A validação de um método analítico consiste na avaliação de alguns parâmetros tais como linearidade, precisão, seletividade e exatidão (ICH, 1996; USP, 2008).

Através de soluções preparadas utilizando o pó de teicoplanina previamente pesado, nas concentrações de 70,0; 80,0; 90,0; 100,0; 110,0 e 120,0  $\mu\text{g/mL}$ , em água purificada, o método foi validado nesta faixa em questão.

#### **5.3.6.1. Precisão**

A precisão de um método é obtida pelo grau de concordância entre os valores de uma série repetida de ensaios analíticos efetuados em uma amostra homogênea.

A precisão do método foi avaliada pelo coeficiente de variação, utilizando teicoplanina pó liofilizado. O ensaio foi realizado em três diferentes dias e em triplicata.

Para o ensaio de precisão, foi preparada uma solução de teicoplanina, em água purificada, com concentração teórica de 500,0  $\mu\text{g/mL}$ . Desta solução, foram transferidas alíquotas de 2,0; 2,2 mL para balões volumétricos de 10 mL e 1,2 mL para balão volumétrico de 5 mL completando o volume com fase móvel (acetonitrila : metanol, 50:50, V/V) para obtenção de soluções de concentrações de 100,0; 110,0 e 120,0  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 17).

Tabela 17 - Preparo ensaio de precisão de teicoplanina em concentração de 100,0 a 120,0 µg/mL por CLAE.

<b>Solução</b>	<b>vol. de sol. de teicoplanina 500 µg/mL (mL)</b>	<b>vol. de água (mL)</b>	<b>concentração final (µg/mL)</b>
1	2,0	8,0	100,0
2	2,2	7,8	110,0
3	1,2	3,8	120,0

Os valores das áreas encontrados para as soluções de teicoplanina, estão representados na Tabela 18.

Tabela 18 - Valores experimentais da teicoplanina pó liofilizado, obtidos por CLAE.

<b>concentração (µg/mL)</b>	<b>área* ± e.p.m.</b>	<b>coeficiente de variação (%)</b>
100,0	557574,9 ± 4439,68	2,39
110,0	620187,1 ± 3735,93	1,81
120,0	678110,4 ± 2944,05	1,30

\* cada valor é a média de nove determinações  
± e.p.m. = erro padrão de média

### 5.3.6.2. Recuperação

O teste de recuperação é utilizado para testar a exatidão do método. Desta forma, quantidades conhecidas de solução de referência foram adicionadas à amostra.

Para o ensaio recuperação, foram preparadas duas soluções com concentração teórica de 900 µg/mL em água purificada, uma com substância de referência de teicoplanina e outra com o pó liofilizado.

Desta solução de referência foi transferido uma alíquota de 1,0 mL e transferido para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se uma solução de referência SR1 de 90,0 µg/mL, em fase móvel (triplicata).

Desta solução amostra, foram transferidas alíquotas de 1,0 mL para balões volumétricos de 10 mL, denominados de A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>. Foram adicionados 0,05; 0,1 e 0,15 mL da solução de referência SR1, nos balões R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, respectivamente. Os volumes foram completados com fase móvel obtendo-se concentrações de 90,0; 94,5; 99,0 e 103,5 µg/mL.

O preparo das soluções pode ser observado na Tabela 19.



Tabela 19 - Preparação das soluções para o teste de recuperação aplicado à amostra de teicoplanina para método de CLAE.

	<b>Vol. de solução amostra 900,0 µg/mL (mL)</b>	<b>Vol. de solução de referência 900,0 µg/mL (mL)</b>	<b>Volume final (mL)</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>
A	1,0	-	10,0	90,0
R <sub>1</sub>	1,0	0,05	10,0	94,5
R <sub>2</sub>	1,0	0,10	10,0	99,0
R <sub>3</sub>	1,0	0,15	10,0	103,5

#### 5.3.6.2.1. Cálculo de teste de recuperação

A porcentagem de recuperação foi calculada pela Equação 6, descrita pela AOAC.

$$R\% = [(C_f - C_u)/C_a].100 \quad \text{Equação 6}$$

Em que:

C<sub>f</sub> = Concentração da substância de referência + concentração da amostra

C<sub>u</sub> = Concentração da amostra

C<sub>a</sub> = Concentração da substância de referência adicionada

Os resultados obtidos no teste de recuperação da teicoplanina estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Teste de recuperação de solução de teicoplanina substância de referência adicionada à solução de teicoplanina frasco-ampola pelo método CLAE.

	<b>conc. adicionada (µg/mL)</b>	<b>área</b>	<b>conc. encontrada (µg/mL)</b>	<b>recuperação (%)</b>
R <sub>1</sub>	4,5	527579,00	4,69	104,37
R <sub>2</sub>	9,0	560095,00	10,40	115,68
R <sub>3</sub>	13,5	580162,67	13,90	102,99

## **5.4. Método microbiológico turbidimétrico**

### **5.4.1. Considerações gerais**

O ensaio microbiológico por turbidimetria consiste na inoculação do meio de cultura recomendado para o ensaio com quantidade conhecida do microrganismo sensível ao antibiótico, de modo que, após incubação aproximada de quatro horas, a turbidez bacteriana no meio seja facilmente quantificada e mantenha correlação entre a dose e a resposta da substância em análise. É recomendado que o ensaio seja executado com três soluções com concentrações que devem estar em progressão geométrica tanto para a amostra como para o padrão (F. Bras. IV, 1988).

### **5.4.2. Preparação do inoculo**

O *S. epidermidis* ATCC 12228 foi inoculado em caldo BHI e incubado em estufa microbiológica a  $35,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 18 horas. A padronização deste inóculo foi feita em espectrofotômetro a 580 nm, obtendo-se transmitância de  $25,0\% \pm 2,0\%$ .

### **5.4.3. Preparação das soluções**

Para os testes preliminares, foram utilizadas quatro concentrações, 40,0; 80,0; 160,0 e 320,0  $\mu\text{g/mL}$ . Foram pesadas 40,0 mg de teicoplanina substância de referência, previamente dessecadas e transferidas para balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com água purificada, para obtenção de solução de teicoplanina com concentração teórica de 800,0  $\mu\text{g/mL}$ . Desta

solução, foram transferidas alíquotas de 0,5; 1,0, 2,0 e 4,0 mL para balões volumétricos de 10 mL completando o volume com água purificada para obtenção de soluções de concentrações de 40,0; 80,0, 160,0 e 320,0 µg/mL (Tabela 21). Estas soluções foram preparadas em triplicatas.

Tabela 21 - Preparo das soluções utilizadas nos testes preliminares do ensaio microbiológico por turbidimetria

<b>Solução</b>	<b>Vol. de teicoplanina 800 µg/mL (mL)</b>	<b>Vol. de água (mL)</b>	<b>Concentração final (µg/mL)</b>
1	0,5	9,5	40,0
2	1,0	9,0	80,0
3	2,0	8,0	160,0
4	4,0	6,0	320,0

#### 5.4.4. Método

Após a preparação e a padronização do inóculo em espectrofotômetro, em um fluxo laminar, em tubos de ensaio contendo 10,0 mL de caldo BHI previamente esterilizados foram adicionados 200 µL de cada uma das soluções padrão descritas nos itens 5.4.3 e 1,0 mL de caldo nutriente inoculado. Foram preparados também os controles negativo (apenas caldo BHI estéril) e positivo (caldo BHI estéril e 1,0 mL de caldo nutriente inoculado).

Estes tubos foram incubados em banho-maria sob agitação mecânica por quatro horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , decorrido o tempo de análise interrompeu-se o

crescimento bacteriano através da adição de 0,5 mL de formaldeído 12%, em todos os tubos inclusive nos controles.

As absorvâncias destas soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 530 nm, utilizando como branco o controle negativo.

Os resultados referentes às absorvâncias, obtidos através dos testes preliminares do ensaio microbiológico por turbidimetria, estão representados na Tabela 22.

Tabela 22 - Absorvâncias determinadas nos testes preliminares do ensaio microbiológico por turbidimetria.

<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Abs média</b>	<b>DPR%</b>
40	0,464	2,20
80	0,293	1,71
160	0,143	1,94
320	0,155	2,25

Devido aos resultados obtidos nos testes preliminares, pode-se observar que a concentração de 320,0  $\mu\text{g/mL}$  apresenta-se fora da faixa de concentração. Portanto, foi selecionou-se a faixa de 40,0 a 160,0  $\mu\text{g/mL}$ .

A representação gráfica das absorvâncias relativas às concentrações de 40,0; 80,0 e 160,0  $\mu\text{g/mL}$ , através da análise preliminar do método microbiológico por turbidimetria, estão representados na Figura 9.

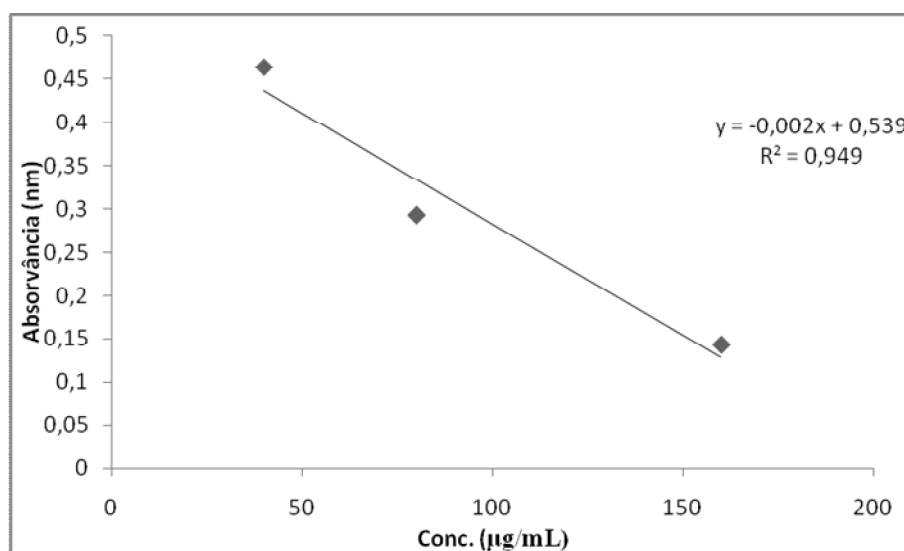


Figura 9 - Representação gráfica da curva analítica obtida através do ensaio microbiológico por turbidimetria.

Este ensaio preliminar permitiu identificar a faixa de concentração que será utilizada no desenvolvimento e validação do método microbiológico proposto.

Porém, os testes subsequentes não se repetiram, não sendo possível reproduzir os resultados nas condições de análise do Laboratório de Controle Microbiológico. Assim sendo, não foi possível desenvolver e validar o método até o presente momento.

Cabe salientar, que o desenvolvimento deste método inicialmente utilizava outro microrganismo, *Bacillus subtilis*, pois é o microrganismo

referenciado pela Farmacopéia Brasileira para análises microbiológicas da vancomicina, mas as mesmas dificuldades na reprodutibilidade dos resultados foram apontadas.

Na expectativa de desenvolvimento do ensaio microbiológico por turbidimetria para doseamento de teicoplanina, em ensaios futuros, algumas modificações estão sendo realizadas, dentre elas utilização de equipamentos mais precisos, por ser tratar de um método muito sensível, no qual qualquer alteração ambiental ou variações causadas pelo equipamento podem interferir nos resultados.

## 6. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS

O estudo comparativo dos métodos desenvolvidos e validados é de extrema importância para verificar a equivalência entre eles, além de demonstrar qual é o método mais indicado para análise de teicoplanina pó liofilizado.

Os resultados experimentais dos métodos validados, espectrofotometria na região ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência, estão representados na Tabela 23.

Tabela 23 - Resultados experimentais obtidos na validação dos métodos propostos.

<b>Parâmetros</b>	<b>UV</b>	<b>CLAE</b>
Faixa de concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	60,0 a 110,0	70,0 a 120,0
Equação: $y = ax + b$	$y = 0,005x - 0,0022$	$y = 6065 x - 35165$
r	0,9995	0,9995
Exatidão (%)	101,54	107,68
Precisão (%)	2,82	1,83



Por meio dos resultados obtidos pode-se observar que o método por espectrofotometria na região ultravioleta demonstrou-se mais exato do que a cromatografia líquida de alta eficiência, porém menos preciso.

Os dados foram tratados estatisticamente para comparar os valores experimentais obtidos para o doseamento dos dois métodos validados. Como pode ser observado nas Tabelas 24 e 25.

Tabela 24 - Quantidade determinada para doseamento de pó liofilizado de 200 mg de teicoplanina através dos métodos, espectrofotometria na região UV e CLAE.

<b>Parâmetros</b>	<b>UV</b>	<b>CLAE</b>
	100,13	100,28
Teor (%)	96,02	97,72
	96,20	99,36
Teor médio (%)	97,45	99,12
CV(%)	2,40	1,31

Tabela 25 – Análise de variância do teor de teicoplanina pó liofilizado obtido pelos dois métodos propostos.

<b>Fontes de variação</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>Variância</b>	<b>F</b>	<b>P*</b>
ENTRE	1	4,18	4,18	1,18	7,71
DENTRO	4	14,15	3,54	-	-
TOTAL	5	18,34	-	-	-

\*significativo  $P < 0,05$

Como pode ser observado através na análise de variância, não houve diferenças significativas entre os dois métodos, portanto os dois métodos se equivalem.

Assim sendo, os dois métodos demonstraram ser adequados para doseamento de teicoplanina pó liofilizado, permitindo assim o uso no controle de qualidade. O método de doseamento por espectrofotometria na região do ultravioleta é um método rápido e tem como vantagem a utilização de água purificada como solvente, além de possuir um custo menor e não causar danos ambientais. O método por cromatografia líquida de alta eficiência apresentou um tempo de retenção baixo, fazendo com que o tempo de análise seja rápido e haja menos consumo de solventes. No entanto, o custo do equipamento e dos solventes de elevada qualidade fazem com que esta técnica seja economicamente mais dispendiosa. Cabe ressaltar, que a cromatografia líquida de alta eficiência é um método mais seletivo quando comparado à espectrofotometria na região visível.

## 7. DISCUSSÃO

Na literatura encontram-se certos artigos que relatam análise de diversos medicamentos através do método espectrofotométrico, como a determinação de omeprazol, lansoprazol e pantoprazol (WAHBI et al., 2002), determinação de meropenem em formas farmacêuticas (MENDEZ et al., 2003) e o doseamento de esparfloxacino e lomefloxacino (MARONA e SCHAPOVAL, 1999; GOMES e SALGADO, 2005).

O espectro de absorção de teicoplanina mostrou pico de absorção máxima em 279 nm, utilizando água como solvente. Com o objetivo de determinar a linearidade, foi realizada curva de Ringbom. De acordo com a Lei de Lambert-Beer, que se baseia na suposição de que a capacidade de absorvidade de um sistema é diretamente proporcional à concentração de soluto, o intervalo de concentração de 60,0 à 110,0 µg/mL mostrou linearidade, apresentando coeficiente de correlação de 0,9995. A equação da reta foi  $y = 0,005x - 0,0022$ .

A análise estatística dos resultados das absorvâncias obtidas foi matematicamente verificada pela análise de variância (ANOVA). Os resultados obtidos, com F significativo para o desvio de linearidade e regressão, validam o método na região do UV para o teicoplanina.

O teor médio do Bactomax® 200 mg encontrado pelo método espectrofotométrico na região ultravioleta a 279 nm foi de 97,45%.

A precisão do método foi avaliada nos testes de repetibilidade (intra e interdia) o coeficiente de variação médio encontrado foi de 2,82. O método

demonstrou seletividade, pois não alterou seus resultados com a adição de 20% do excipiente NaCl na solução, ou seja, as absorvâncias não se alteraram em nenhuma das seis concentrações. O teste de recuperação tem como objetivo, comprovar a exatidão do método. A média dos valores obtidos no teste de recuperação foi de 101,54%. Com este resultado comprovou-se a exatidão do método proposto.

O método de quantificação por espectrofotometria na região de ultravioleta foi então validado através de análise estatística e fatores como linearidade, precisão, seletividade e exatidão.

A cromatografia de alta eficiência (CLAE) é atualmente um dos métodos mais utilizados para doseamento de substâncias químicas. As monografias contidas em compêndios oficiais, na sua maior parte, utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência como método de doseamento de produtos. É uma técnica bastante específica e seletiva, embora seja um método analítico de alto custo.

Na literatura foram encontrados diversos trabalhos que evidenciam o doseamento de fármacos através do método de cromatografia líquida de alta eficiência, tais como o esparfloxacino (MARONA e SCHAPOVAL, 1999), flutamida em comprimidos (SALGADO et al., 2005), gatifloxacino em comprimidos (SALGADO e LOPES, 2006) e vancomicina (VILA et al., 2007).

A fase móvel utilizada foi metanol : acetonitrila (50:50, V/V), obtendo-se tempo de retenção de aproximadamente 1,8 minutos, o que facilita o doseamento, pois é rápido, o que causa economia de solvente.

Os resultados permitiram a construção da curva analítica na faixa de concentração de 70,0 a 120,0 µg/mL, cuja equação da reta obtida foi  $y = 6065x - 35165$  e o coeficiente de correlação encontrado foi 0,9995.

A análise estatística dos resultados das áreas obtidas foi matematicamente verificada pela análise de variância (ANOVA). Os resultados obtidos, com F significativo para o desvio de linearidade e regressão, validam o método de cromatografia líquida de alta eficiência para a teicoplanina.

O teor médio do Bactomax® 200 mg encontrado pelo método cromatográfico foi de 99,12%.

A precisão do método foi avaliada nos testes de repetibilidade (intra e interdia) na qual o coeficiente de variação médio foi de 1,31. O método apresenta seletividade, pois não houve alteração dos resultados com a adição de 20% do excipiente NaCl na solução, ou seja, o pico de absorção e o tempo de retenção não sofreram alterações significativas em nenhuma das 6 concentrações testadas.

A robustez do método foi confirmada através da alteração da porcentagem dos solventes na fase móvel (metanol : acetonitrila, 55:45, V/V). Com essa mudança não houve variação no pico de absorção, nem no tempo de retenção.

O teste de recuperação tem como objetivo comprovar a exatidão do método. A média dos valores obtidos no teste de recuperação foi de 107,68%. Com este resultado foi comprovada a exatidão do método proposto.

O método de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvido não apresentou picos relativos a excipientes ou outros

interferentes presentes na amostra e foi validado através de análise estatística por meio de fatores como linearidade, precisão, seletividade, robustez e exatidão.

O ensaio microbiológico por turbidimetria é menos frequentemente utilizado para dosear fármacos, sendo mais utilizado o método de doseamento microbiológico por difusão em ágar. Foram encontrados na literatura alguns trabalhos em que foram desenvolvidos métodos de análise por difusão em ágar de fármacos como terbinafina em comprimidos e cremes (CARDOSO e SCHAPOVAL, 2000) e cetoconazol em xampu (STAUB et al., 2005).

O método turbidimétrico é mais rápido do que o de difusão em ágar, utilizou água como solvente, o que representa uma característica positiva devido ao baixo custo e ausência de dano ambiental, porém é muito sensível o que dificultou o seu desenvolvimento. Neste trabalho não foi possível desenvolver e validar este método, mas outras tentativas serão realizadas.

Não existem especificações oficiais para o teor de teicoplanina pó liofilizado, no entanto os limites preconizados pela USP 31, para a determinação do teor de vancomicina, fármaco que possui a estrutura semelhante à teicoplanina, encontra-se na faixa de 90 a 115,0%. Assim sendo, os teores encontrados para as amostras validadas pelos dois métodos encontram-se dentro dos limites usuais.

O controle de qualidade tem grande importância nas indústrias farmacêuticas, pois através desta ferramenta é possível determinar a qualidade tanto da matéria-prima como do medicamento produzido. Para garantir a qualidade dos resultados é necessário, além de analistas aptos, procedimentos e equipamentos previamente validados.

Nas indústrias e em laboratórios, é de fundamental importância o controle da validade dos métodos analíticos utilizados para acompanhar as características da qualidade dos produtos. Para manter a qualidade do produto final, o método tem que ser capaz de atingir seus objetivos e não pode perder a validade ao longo das análises (GOVAERTS et al., 2008).

Cabe salientar que o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos são de suma importância para o controle de qualidade do medicamento produzido por uma empresa farmacêutica, pois é uma garantia da qualidade final do produto. Desta forma, destaca-se a necessidade de desenvolvimento e validação de métodos de análise para a teicoplanina.

## 8. CONCLUSÃO

- Foi desenvolvido e validado um método de análise da teicoplanina injetável por espectrofotometria na região ultravioleta a 279 nm, utilizando com solvente água purificada, na faixa de concentração de 60,0 à 110,0 µg/mL. O método demonstrou ser linear, preciso e exato.
- Foi desenvolvido e validado um método de análise da teicoplanina injetável por CLAE a 279 nm, utilizando metanol : acetonitrila (50 : 50, V/V) como fase móvel, na faixa de concentração de 70,0 à 120,0 µg/mL. O método apresentou linearidade, precisão e exatidão.
- Não foi possível validar o doseamento microbiológico turbidimétrico de teicoplanina devido a variação dos resultados. Novas tentativas serão realizadas.
- A análise comparativa dos métodos por espectrofotometria na região ultravioleta a 279 nm e por cromatografia líquida de alta eficiência demonstrou que os métodos são estatisticamente equivalentes.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15. ed. Arlington, 1990. v.1, p.xvii.

ATAHAN, E.; GUL, M.; ERGUN, Y.; EROGLU, E. Vascular graft infection by *Staphylococcus aureus*: efficacy of cefazolin, teicoplanin and vancomycin prophylaxis protocols in a rat model. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v.34, p.182-187, 2007.

BARBOT, A.; VENISSE, N.; RAYEH, F.; BOUQUET, S.; DEBAENE, B.; MIMOZ, O.; Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sequential intravenous and subcutaneous teicoplanin in critically ill patients without vasopressors. **Intensive Care Medicine**, v.29, p.1528-1534, 2003.

BERNARDES, R.C.; JORGE, A.O.C.; LEÃO, M.V.P. Sensibilidade à oxaciclina, vancomicina e teicoplanina de *Staphylococcus* coagulase-positivos isolados de pacientes hospitalizados em São José dos Campos. **Revista Biociências**, v.10, p.73-78, 2004.

BERNAREGGI, A.; BORGHI, A.; BORGONOV, M.; CAVENAGHI, L.; FERRARI, P.; VÉKEY, K.; ZANOL, M.; ZERILLI, L.F. Teicoplanin metabolism in humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.36, p.1744-1749, 1992.

BISCHOFF, M.; BERGER-BACHI, B. Teicoplanin stress-selected mutations increasing  $\sigma$  B activity in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.5, p.1714-1720, 2001.

BRASIL(a). Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 899 de 29 de maio de 2003. Aprova o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União. Brasília, 02 de junho de 2003, seção 1.

CARDOSO, S.G.; SCHAPOVAL, E.E.S. Microbiological assay for terbinafine hydrochloride in tablets and creams. **International Journal of Pharmaceutics**, v.203, p.109–113, 2000.

CHAN, Y.Y.; NASIR, M.H.B.A.; YAHAYA, M.A.B.; SALLEH, N.M.A.B.; DAN, A.D.B.M.; MUSA, A.M.B.; RAVICHANDRAN, M. Low prevalence of vancomycin- and bifunctional aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry farms in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 221-226, 2008.

FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FURTADO, G.H.C.; MARTINS, S.T.; COUTINHO, A.P.; SOARES, G.M.M.; WEY, S.B.; MEDEIROS, E.A.S. Incidência de Enterococcus resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.39, n.1, p.41-46, 2005.

GARCIA QUETGLAS, E.; PEREA, J.R.A.; DÍAZ de RADA, B.S.; ALDEA, G. Farmacología de antimicrobianos utilizados em el tratamiento de las infecciones graves por bacterias gram-positivas. **Revista Española de Quimioterapia**, v.16, p.277-288, 2003.

GHISELLI, R.; CIRIONI, O.; GIACOMETTI, A.; SCALISE, A.; SIMONETTI, O. MOCCHIGIANI, F.; ORLANDO, F.; GOTERI, G.; VITTORIA, A.D.; FILOSA, A.; SILVESTRI, C.; OFFIDANI, A.; BERTANI, A.; SCALISE, G.; SABA, V. Comparative efficacy of topical versus systemic teicoplanin in experimental model of wound infections. **Journal of Surgical Research**, v.144, p.74-81, 2008.

GOMES, G.C.; SALGADO, H.R.N. Validation of UV spectrophotometric method for determination of lomefloxacin in pharmaceutical dosage form. **Acta Farm. Bonaerense**, v.24, n.3, p.406-408, 2005.

GOMEZ-GARCÉS, J.L.; ALOS, J.I.; TAMAYO, J. In vitro activity of linezolid and 12 other antimicrobials against coryneform bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, p.688-692, 2007.

GOODMAN, A.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.859-1011.

GOVAERTS, B.; DEWÉ, W.; MAUMY, M.; BOULANGER, B. Pre study analytical method validation: comparison of four alternative approaches based

On quality-level estimation and tolerance intervals. **Quality and reliability engineering international**, v.24, p.667-680, 2008.

HAHN-AST, C.; GLASMACHER, A.; ARNS, A.; MUHLING, A.; ORLOPP, K.; MARKLEIN, G.; VON LILIENFELD-TOAL, M. An audit of efficacy and toxicity of teicoplanina versus vancomycin in febrile neutropenia: Is the different toxicity profile clinically relevant? **Infection**, v.36, n.1, p.54-58, 2008.

HANADA, K.; KOBAYASHI, A.; OKAMORI, Y.; KIMURA, T.; OGATA, H. Improved quantitative determination of total and unbound concentrations of six teicoplanin components in human plasma by high performance liquid chromatography. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v.28, n.10, p.2023-2025, 2005.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Guideline on validation of Analytical Procedure: Methodology, 1996.

JOOS, B.; LÜTHY, R. Determination of teicoplanin concentrations in serum by high-pressure liquid chromatography. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.31, p.1222-1224, 1987.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. p.575-617.

KOROLKOVAS, A. **Análise Farmacêutica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988.

MACHADO, J.K.K.; FEFERBAUM, R.; KOBAYASHY, C.E.; SANCHES, S.; SANTOS, S.R.C.J. Vancomycin pharmacokinetics in preterm infants. **Clinics**, v.62, n.4, p.405-410, 2007.

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. A high-performance liquid chromatographic assay of sparfloxacin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.20, p.413-7, 1999.

MARONA, H.R.N.; SCHAPOVAL, E.E.S. Spectrophotometric determination of sparfloxacin in tablets. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v.44, p.136-137, 1999.

MARTINDALE, THE COMPLETE DRUG REFERENCE. 35<sup>o</sup> ed. Pharmaceutical Press, 2006.

MATTHEWS, P.C.; TAYLOR, A.; BYREN, I.; ATKINS, B.L. Teicoplanin levels in bone and joint infections: Are standard doses subtherapeutic? **Journal of Infection**, v.55, p.408-413, 2007.

MCCALLUM, N.; KARAUZUM, H.; GETZMANN, R.; BISCHOFF, M.; MAJCHERCZYK, P.; BERGER-BÄCHI, B.; LANDMANN, R. In vivo survival of

teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* and fitness cost of teicoplanin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.2352-2360, 2006.

MCCANN, S.J.; WHITE, L.O.; KEEVIL, B. Assay of teicoplanin in serum: comparison of high-performance liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassay. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.107-110, 2002.

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

MTYNARCZYK, G.; GRZYBOWSKA, W.; MTYNARCZYK, A.; TYSKI, S.; KAWECKI, D.; LUCZAK, M.; CHMURA, A.; ROWINSKI, W. Significant increase in the isolation of glycopeptide-resistant enterococci from patients hospitalized in the transplant surgery. **Transplantation Proceedings**, v.39, p.2883-2885, 2007.

ÖZKAN, B.; KARABAS, V.L.; GÜNDES, S.; ALUNTAS, O.; ETILER, N.; CAGLAR, Y. Effect of vancomycin, teicoplanin, and cefuroxime on *Staphylococcus epidermidis* adherence to intraocular lenses. **Journal of Cataract Refract Surgery**, v.31, p.1814-1820, 2005.

PEA, F.; VIALE, P.; PAVAN, F.; TAVIO, M.; POZ, D.; BELTRAME, A.; FURLANUT, M. The effect of multifactorial, multidisciplinary education intervention on appropriate use of teicoplanin. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.27, p.344-350, 2006.

PORTOLÉS, A.; PALAU, E.; PUERRO, M.; VARGAS, E.; PICAZO, J.J. Health economics assessment study of teicoplanin versus vancomycin in Gram-positive infectious. **Revista Española de Quimioterapia**, v.19, p.65-75, 2006.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001. p.589.

ROUVEIX, B.; JEHL, F.; DRUGEON, H.; BRUMPT, I.; CAULIN, E. Randomized comparison of serum teicoplanin concentrations following daily or alternate daily dosing in healthy adults. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.7, p.2394-2399, 2004.

SALGADO, H.R.N.; MENEZES, M.L.; STORTI, M.P.B. Determination of flutamide in tablets by high-performance liquid chromatography. **Acta Pharmaceutica Bonaerense**, v.24, n.2, p.246-249, 2005.

SALGADO, H.R.N.; LOPES, C.C.G.O. A high performance liquid chromatographic assay of gatifloxacin in tablets. **Journal of AOAC International**, v.89, n.3, p.642-645, 2006.

SATO, M.; CHIDA, K.; SUDA, T.; MURAMATSU, H.; SUZUKI, Y.; HASHIMOTO, H.; GEMMA, H.; NAKAMURA, H. Recommended initial loading dose teicoplanin, established by therapeutic drug monitoring, and outcome in terms of optimal trough level. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.12, p.185-189, 2006.

SHEN, J.; JIAO, Z.; ZHOU, Y.; ZHU, H.; SONG, Z. Quantification of Teicoplanin in human plasma by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Chromatographia**, v.65, p.9-12, 2007.

SHIME, M.; KATO, Y.; KOSAKA, T.; KOKUFU, T.; YAMAGISHI, M.; FUJITA, N. Glycopeptide pharmacokinetics in current paediatric cardiac surgery practice. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v.32, p.577-581, 2007.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SA, M.M.; TEREZI, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v.29, n.4, p.844-855, 2006.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006. p.933-1009.

SIPAHI, O.R.; ARDA, B.; YURTSEVEN, T.; SIPAHI, H.; OZGIRAY, E.; SUNTUR, B.M.; ULUSOY, S. Vancomycin versus teicoplanin in the therapy of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) meningitis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, p.412-415, 2005.



STAUB, I.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BERGOLD, A. M. Microbiological assay of ketoconazole in shampoo. **International Journal of Pharmaceutics**, v.292, p.195–199, 2005.

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological. 14<sup>th</sup> Maryadele J. O'Neil, 2006.

USP 31. The United States Pharmacopoeia. Rockville: USP Convention, 2008.

VILA, M.M.D.C.; OLIVEIRA, R.M.; GONÇALVES, M.M.; TUBINO, M. Analytical methods for vancomycin determination in biological fluids and in pharmaceuticals. **Química Nova**, v.30, n.2, p.395-399, 2007.

WAHBI, A.; ABDEL-RAZAK, O.; GAZY, A.A.; MAHGOUB, H.; MONEEB, M.S. Spectrophotometric determination of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.30, p.1133-1142, 2002.

WILSON, A.P.R.; CEPEDA, J.A.; HAYMAN, S.; WHITEHOUSE, T.; SINGER, M.; BELLINGAN, G. In vitro susceptibility of Gram-positive pathogens to linezolid and teicoplanin and effect on outcome in critically ill patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.470-473, 2006.

YENICE, I.; ÇALIS, S.; ATILLA, B.; KAS, H.S.; OZALP, M.; EKIZOGLU, M.; BILGILI, H.; HINCAL, A.A. In vitro/in vivo evaluation of efficiency of teicoplanin-

loaded biodegradable microparticles formulated for implantation to infected bone defects. **Journal of Microencapsulation**, v.20, p.705-717, 2003.