UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Câmpus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de vancomicina pó liofilizado para solução injetável

Patrícia Aleixa do Nascimento

Orientador (a): Profª Drª Hérida Regina Nunes Salgado

Coorientadora: Profª Drª Ana Carolina Kogawa

Araraquara - SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Câmpus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de vancomicina pó liofilizado para solução injetável

Aluno: Patrícia Aleixa do Nascimento

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como exigência para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador (a): Profª Drª Hérida Regina Nunes Salgado

Coorientadora: Profª Drª Ana Carolina Kogawa

Araraquara – SP

2020

N245d

Nascimento, Patrícia Aleixa do.
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação de vancomicina pó liofilizado para solução injetável / Patrícia Aleixa do Nascimento. – Araraquara: [S.n.], 2020.
159 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Hérida Regina Nunes Salgado.
Coorientadora: Ana Carolina Kogawa.

1. Vancomicina. 2. Química Analítica Verde. 3. Controle de Qualidade. 4. Validação. 5. CLAE. 6. Espectrofotometria. 7. Turbidimetria. I. Salgado, Hérida Regina Nunes, orient. II. Kogawa, Ana Carolina, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para Quantificação de Vancomicina Pó Liofilizado para Solução Injetável

AUTORA: PATRÍCIA ALEIXA DO NASCIMENTO
ORIENTADORA: HERIDA REGINA NUNES SALGADO
COORIENTADORA: ANA CAROLINA KOGAWA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ANA CAROLINA KOGAWA
Departamento de Farmácia / Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. DANIELE MICHELIN PAGANOTTE
Departamento de Farmácia / Centro Universitário da Fundação Herminio Ometto

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 27 de fevereiro de 2020

Dedico este trabalho aos meus pais, Jair e Teresinha e ao meu irmão, João Paulo pelo incentivo, compreensão e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo, é a razão da minha vida, minha alegria, força e esperança e o responsável pela realização deste trabalho.

À minha família, pilar fundamental de sustentação e incentivo ao longo de minha vida. Sou abençoada por ter vocês.

À minha orientadora Professora Doutora Hérida Regina Nunes Salgado, pelo companheirismo, compreensão e colaboração.

À minha coorientadora Doutora Ana Carolina Kogawa pela disposição em ensinar e ajudar, esse é o seu talento.

Aos meus colegas de laboratório pelo convívio harmonioso, aprendizado, auxílio e momentos de diversão: Clara Bersi, Jéssica Richardi, Bianca Aparecida de Marco Segatto e Caroline Magnani Spagnol.

Aos docentes do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

À secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, em especial à Cláudia pela paciência e prestatividade. Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas por sete anos de experiências que eu jamais imaginaria. Tem sido um prazer fazer parte desta história.

À indústria farmacêutica ABL Antibióticos do Brasil LTDA pelo fornecimento do padrão secundário e forma farmacêutica da vancomicina utilizados neste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido, processo FAPESP 2018/02540-6. E à CAPES código de financiamento 001.

“Porque desde a antiguidade não se ouviu, nem com ouvidos se percebeu, nem com olhos se viu um Deus além de ti, que trabalhe para aquele que nele espera”.

Isaías 64. 4

RESUMO

Os antibióticos glicopeptídicos são uma classe de antimicrobianos que se apresenta como uma importante alternativa para o tratamento de infecções causadas por algumas cepas bacterianas resistentes. Estudos presentes na literatura relacionadosà vancomicina (glicopeptídeo de primeira geração) e métodos analíticos apresentam propostas eficazes para sua quantificação, entretanto, observa-se um predomínio no uso de solventes tóxicos, que contribuem para a geração de resíduos, que podem ser prejudiciais ao meio ambiente, ao operador e reduzir a vida média dos materiais utilizados nas análises. Desta forma, foram propostos quatro novos métodos analíticos para a análise quantitativa de vancomicina em pó liofilizado para solução injetável, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrofotometria região do ultravioleta (UV) e na região do infravermelho (IV) e análise microbiológica por turbidimetria. A proposta deste trabalho foi desenvolver e validar métodos de análise, objetivando métodos inovadores, rápidos e com uso de solventes de baixa toxicidade, minimizando, assim, as ações tóxicas aos operadores bem como resíduos ao meio ambiente, seguindo os princípios da Química Analítica Verde. As análises qualitativas foram realizadas para o peso médio, faixa de fusão, cromatografia em camada delgada, UV, IV, CLAE e turbidimetria, possibilitando a identificação deste fármaco na forma de pó liofilizado. Para a análise quantitativa, foram desenvolvidos e validados métodos para a quantificação de vancomicina em pó liofilizado por espectrofotometria na região do UV(linear entre 50 e 150 µg/mL, preciso com desvio padrão relativo – DPR – de até 1,90 %, exato com recuperação de 101,10 %, seletivo perante degradação ácida, alcalina, neutra, oxidativa e fotolítica, robusto perante modificações na comprimento de onda, volume da cubeta, filtração, marca do fosfato monobásico e dibásico de potássio, tempo de ultrassom e fonte de água), IV (linear entre 1,0 e 2,0 mg/10 mg, preciso com DPR de até 3,12 %, exato com recuperação de 99,37 %, seletivo perante a sobreposição dos espectro de vancomicina amostra e referência, robusto perante modificações na força de compressão), CLAE (linear entre 40 e 140 µg/mL, preciso com DPR de até 2,35 %, exato com recuperação de 100,19 %, seletivo perante degradação ácida, alcalina neutra, oxidativa e fotolítica, robusto perante modificações no comprimento de onda, concentração de ácido na fase móvel, marca de etanol, proporção da fase móvel, tempo de ultrassom e fonte de água) e turbidimetria (linear entre 30 e 50,7 µg/mL, preciso com DPR de até 4,42 %, exato com recuperação de 100,71 %, seletivo perante a comparação das absorbâncias de vancomicina amostra e referência, robusto perante modificações no comprimento de onda de leitura e temperatura de incubação),atendendo os limites propostos pela legislação para cada parâmetro de validação. Além disso, estes quatro métodos foram comparados estatisticamente, mostrandoque as técnicas CLAE e UV são intercambiáveis entre si ($t_{calculado}$ 0,049 < $t_{tabelado}$ 2,77), devendo sempre estar associadas ao método microbiológico por ser um fármaco antimicrobiano. Assim, o trabalho traz métodos ecologicamente sustentáveis para a análise farmacêutica da vancomicina em produto farmacêutico.

Palavras-chave: Vancomicina; Química Analítica Verde; Controle de Qualidade; Validação; CLAE; Espectrofotometria; Turbidimetria.

ABSTRACT

The glycopeptide antibiotics are a class of antimicrobial agents that is an important alternative for the treatment of infections caused by some resistant bacterial strains. Studies found in literature relating vancomycin (first generation glycopeptide) and analytical methods show effective proposals for its quantification, however, there is a prevalence in the use of toxic solvents, that contributes to the generation of waste, that can be harmful to the environment, to the operator and reduce the half-life of the materials used in the analysis. In this way, it was proposed four new analytical methods for the quantitative analysis of vancomycin lyophilized powder for injectable solution, using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), spectrophotometry in ultraviolet region (UV), in infrared region (IR) and the microbiological analysis using turbidimetry. The proposal of this work was to develop and validate analytical methods, aiming innovative and quickly methods, with the use of organic solvents of low toxicity, minimizing, in this way, the toxic action against the operators, as well as, the generation of waste to the environment, following the Green Analytical Chemistry principles. The qualitative analysis was performed by average weight, melting point, thin layer chromatography, UV, IR, HPLC and turbidimetry, making possible the identification of this drug in dosage form. For quantitative analysis, it was developed and validated analytical methods for quantification of vancomycin using UV (linear between50 to 150 µg/mL, precisewith relative standard deviation – RSD – up to 1.90 %, accuratewith mean recovery of 101.10 %, selectiveunder acid, alkaline, aqueous, oxidative and photolitic degradation, robustwhen variations were performed in wavelength, cubette volumn, filtration, monobasic and dibassic phosphate brand, ultrasound time and source of water), IR (linear between 1.0 to 2.0 mg/150 mg, precisewith RSD up to 3.12 %, accurate with mean recovery of 99.37 %, selectivewhen vancomycin sample and reference spectra were overlapped, robustwhen variations were performed in strength of compression), HPLC(linear between 40 to 140 µg/mL, precisewith RSD up to 2.35%, accurate with mean recovery of 100,19 %, selective under acid, alkaline, aqueous, oxidative and photolytic degradation, robustwhen variations were performed in wavelength, acid concentration in mobile phase, ethanol brand, mobile phase proportion, ultrasound time and source of wwater) andbioassay turbidimetry (linear between 30 and 50.7 µg/mL, precise with RSD up to 4.42%, accurate ith mean recovery of 100.71 %, selectivewhen vancomycin sample and reference absorbance values were compared, robust when variations were performed in wavelength and temperature of incubation), in accordance with the legislation stipulated limits for each validation parameter. Moreover, these four analytical methods were statistically compared and proved that the HPLC and UV methods are interchangeable ($t_{calculated}$ 0.049 < $t_{tabulated}$ 2.77), and must always be apllied in association with the microbiological method, because this is an antimicrobial drug. In this way, this work proposes ecologically correct and sustainable methods for pharmaceutical analysis of vancomycin dosage form.

Keywords: vancomycin; Green Analytical Chemistry; Quality Control; Validation; HPLC; Spectrophotometry; Turbidimetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação da vancomicina, mostrando as regiões de ligação de hidrogênio da molécula do fármaco com o resíduo D-Ala-D-Ala. 26
Figura 2. Composição da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. 27
Figura 3. Estrutura fundamental dos antibióticos glicopeptídicos com os aminoácidos alifáticos (em vermelho) e aromáticos (em azul). 28
Figura 4. Estrutura da vancomicina (CAS – 1404-90-6), em destaque, pelas setas, os grupos substituintes. 30
Figura 5. Estrutura da vancomicina 63
Figura 6. Variação do peso das vinte unidades de frasco ampola de vancomicina pó liofilizado para solução injetável. 69
Figura 7. Determinação da faixa de fusão de vancomicina substância química de referência. (A) capilar com vancomicina referência antes do ensaio. (B) capilar com vancomicina referência após aquecimento a 250 °C. 70
Figura 8. Perfil cromatográfico de vancomicina SQR (P) e vancomicina pó liofilizado para solução injetável (A) com visualização em câmara UV a 254 nm e sistema eluente composto de água + 0,6 % ácido fórmico: etanol (90:10; v,v). 74
Figura 9. Sobreposição dos espectros de vancomicina pó liofilizado em água (preto), água: etanol (90:10) (vermelho), água: etanol (95:05) (verde), solução tamponante pH 6,8 (azul) e pH 8,5 (vinho) na concentração de 50 µg/mL. 76
Figura 10. Sobreposição de vancomicina referência (preto) e pó liofilizado para solução injetável (vermelho) em solução tamponante fosfato de potássio pH 6,8, na concentração de 100 µg/mL. 77
Figura 11. Sobreposição dos espectros de vancomicina SQR (vermelho) e pó liofilizado para solução injetável (preto) na concentração de 1,6 mg/150 mg, obtidos na região do infravermelho em pastilhas de KBr. 79
Figura 12. Sobreposição dos cromatrogramas de vancomicina referência (preto) e pó liofilizado (azul) na concentração de 50 µg/mL. 84
Figura 13. Curva de Ringbom para vancomicina SQR. 95
Figura 14. Sobreposição dos espectros obtidos para vancomicina SQR (preto) e pó liofilizado para solução injetável (vermelho) na concentração de 100 µg/mL. 96
Figura 15. Sobreposição dos espectros obtidos na degradação ácida (HCl 0,01 M – 60 ºC) nos tempos 0 (preto) e 8 horas (vermelho) para vancomicina pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região do UV. 97

Figura 16. Sobreposição dos espectros obtidos na degradação alcalina (NaOH 0,1 M – 60 ºC) nos tempos 0 (preto) e 8 horas (vermelho) para vancomicina pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região do UV. 97
Figura 17. Sobreposição dos espectros obtidos na degradação oxidativa (H_2O_2 0,3 % – 60 ºC) nos tempos 0 (preto) e 8 horas (vermelho) para vancomicina pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região do UV. 98
Figura 18. Sobreposição dos espectros obtidos na degradação neutra (água purificada – 60 ºC) nos tempos 0 (preto) e 24 horas (vermelho) para vancomicina pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região do UV. 98
Figura 19. Sobreposição dos espectros obtidos na degradação fotolítica (solução tamponante pH 6,8 – 254 nm) nos tempos 0 (preto) e 24 horas (vermelho) para vancomicina pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região do UV. 99
Figura 20. Curva analítica para vancomicina referência nas concentrações de 50, 70, 90, 110, 130 e 150 µg/mL, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV a 280 nm. 100
Figura 21. Gráfico de dispersão dos resíduos para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do UV. 101
Figura 22. Sobreposição dos espectros obtidos para vancomicina SQR e pó liofilizado para solução injetável na concentração de 1,6 mg/150 mg. 108
Figura 23. Curva analítica para vancomicina referência nas concentrações de 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2,0 mg/150 mg, obtida pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho na região de 1450-1375 1/cm. 109
Figura 24. Gráfico de dispersão dos resíduos para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho. 110
Figura 25. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para vancomicina referência (azul) e pó liofilizado (preto) pelo método cromatográfico proposto. 118
Figura 26. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na degradação ácida (HCl 0,01 M – 60 ºC) nos tempos 0 (em preto) e 8 horas (em azul) para vancomicina pó liofilizado pelo método cromatográfico proposto. 119
Figura 27. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na degradação alcalina (NaOH 0,01 M – 60 ºC) nos tempos 0 (em preto) e 8 horas (em azul) para vancomicina pó liofilizado pelo método cromatográfico proposto. 119
Figura 28. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na degradação oxidativa (H_2O_2 0,3 % – 60 ºC) nos tempos 0 (em preto) e 8 horas (em azul) para vancomicina pó liofilizado pelo método cromatográfico proposto. 120

Figura 29. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na degradação neutra (água purificada – 60 ºC) nos tempos 0 (em preto) e 8 horas (em azul) para vancomicina pó liofilizado pelo método cromatográfico proposto. 120
Figura 30. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na degradação fotolítica (Solução tamponante pH 6,8 – luz UV a 254 nm) nos tempos 0 (em preto) e 24 horas (em azul) para vancomicina pó liofilizado pelo método cromatográfico proposto. 121
Figura 31. Curva analítica para vancomicina referência nas concentrações de 40, 60, 80, 100, 120 e 140 µg/mL, obtida pelo método cromatográfico a 280 nm. 122
Figura 32. Gráfico de dispersão dos resíduos para vancomicina pelo método cromatográfico proposto. 123
Figura 33. Curva analítica para vancomicina referência e pó liofilizado nas concentrações de 30, 39 e 50,7 µg/mL, obtida pelo método turbidimétrico proposto. 132
Figura 34. Gráfico de dispersão dos resíduos para vancomicina referência pelo método turbidimétrico proposto. 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos analíticos para quantificação de vancomicina 33
Tabela 2. Métodos analíticos para quantificação de vancomicina em Compêndios Oficiais . 60
Tabela 3. Peso médio da vancomicina pó liofilizado para solução injetável 68
Tabela 4. Sistemas eluentes testados em CCD para vancomicina 72
Tabela 5. Diluentes testados para o desenvolvimento do método espectrofotométrico na região do UV a 280 nm e as respectivas concentrações utilizadas 76
Tabela 6. Grupos funcionais da vancomicina que absorvem na região do infravermelho médio 80
Tabela 7. Condições cromatográficas testadas para desenvolvimento de método por HPLC para vancomicina 82
Tabela 8.*System suitability* para o método proposto 83
Tabela 9. Condições cromatográficas estabelecidas para vancomicina 83
Tabela 10. Preparo das soluções para obtenção da exatidão pelo método espectrofotométrico na região do UV para vancomicina 92
Tabela 11. Parâmetros alterados para avaliação da robustez do método por Youden & Steiner (1975) para o método espectrofotométrico proposto 92
Tabela 12. Valores de absorvância obtidos para construção da curva de Ringbom para vancomicina 94
Tabela 13. Valores de degradação de vancomicina pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região do UV proposto 99
Tabela 14. Análise de variância obtida para os valores de absorvância determinados nas curvas analíticas para vancomicina referência, para o método espectrofotométrico na região do UV 100
Tabela 15. Valores de precisão intradia, interdias e intermediária, ANOVA e Testes F e t para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do UV 101
Tabela 16. Recuperação obtida para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do UV 102
Tabela 17. Resultados obtidos na robustez do método espectrofotométrico na região do UV para vancomicina 102
Tabela 18. Doseamento para vancomicina para o método espectrofotométrico na região do UV 103
Tabela 19. Preparo das pastilhas de vancomicina para exatidão pelo método espectrométrico na região do infravermelho 107

Tabela 20. Parâmetros alterados para robustez para o método proposto 107
Tabela 21. Valores de absorvância obtidos para vancomicina referência usando o método espectrofotométrico na região do UV proposto..... 108
Tabela 22. Análise de variância obtida para os valores de absorvância determinados nas curvas analíticas para vancomicina referência, para o método espectrofotométrico na região do infravermelho..... 110
Tabela 23. Valores de precisão intradia, interdias e intermediária, ANOVA e Teste F e Teste t para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho..... 111
Tabela 24. Recuperação obtida para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho..... 111
Tabela 25. Resultados da robustez obtida para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho proposto 112
Tabela 26. Doseamento da vancomicina usando o método espectrofotométrico na região do infravermelho proposto 112
Tabela 27. Preparo das soluções de vancomicinapara exatidão do método cromatográfico proposto..... 117
Tabela 28. Parâmetros alterados na robustez e avaliados pelo método de Youden & Steiner (1975) usando o método cromatográfico proposto 117
Tabela 29. Valores de degradação de vancomicina pó liofilizado pelo método cromatográfico proposto..... 121
Tabela 30. ANOVA obtida para os valores de área determinados nas curvas analíticas para vancomicina referência, para o método cromatográfico proposto..... 122
Tabela 31. Valores de precisão intradia, interdias e intermediária, ANOVA e teste F e Teste t para vancomicina usando o método cromatográfico proposto 123
Tabela 32. Recuperação obtida para vancomicina usando método cromatográfico proposto 124
Tabela 33. Resultados obtidos na robustez para vancomicina usando método cromatográfico proposto..... 124
Tabela 34. Doseamento para vancomicina pó liofilizado usando o método cromatográfico proposto..... 125
Tabela 35. Condições testadas para desenvolvimento de método microbiológico turbidimétrico para vancomicina 128
Tabela 36. Condições estabelecidas para o método turbidimétrico para vancomicina..... 129
Tabela 37. Valores de absorvância e potência obtidos para vancomicina 129

Tabela 38. Preparo das soluções de vancomicina para exatidão pelo método turbidimétrico proposto 131
Tabela 39. Parâmetros alterados para robustez pelo método turbidimétrico proposto 132
Tabela 40. ANOVA obtida para os valores de absorvância determinados nas curvas analíticas para vancomicina referência, para o método turbidimétrico proposto 133
Tabela 41. Valores de precisão intradia, interdias e intermediária, ANOVA e teste F e Teste t para vancomicina usando o método turbidimétrico proposto 134
Tabela 42. Recuperação obtida para vancomicina usando método turbidimétrico proposto 134
Tabela 43. Resultados obtidos na robustez para vancomicina usando método cromatográfico proposto 135
Tabela 44. Determinação da potência para vancomicina pó liofilizado usando o método turbidimétrico proposto 135
Tabela 45. Aplicabilidade, precisão e exatidão dos métodos de espectrofotometria na região do UV, IV, HPLC e turbidimétrico validados 137
Tabela 46. Valores obtidos na determinação do teor de vancomicina pó liofilizado utilizando os métodos de espectrofotometria na região do UV, IV, CLAE e turbidimétrico 138
Tabela 47. ANOVA para o doseamento de vancomicina pó liofilizado pelos métodos de espectrofotometria na região do UV, IV e CLAE 138
Tabela 48. ANOVA para o doseamento de vancomicina pelos métodos físico–químicos e microbiológico 139
Tabela 49. Análise comparativa dos métodos em pares por teste F e teste t 139

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Equação para cálculo do limite de detecção..... 86
Equação 2. Equação para cálculo do limite de quantificação. 86
Equação 3. Equação para cálculo da precisão..... 87
Equação 4. Equação para cálculo da exatidão..... 88
Equação 5. Cálculo do teor de vancomicina amostra. 93

LISTA DE ABREVIATURAS

2D – LC: Cromatografia líquida bidimensional

Abs: Absorvância de vancomicina amostra

Absr: Absorvância de vancomicina referência

Aç: Açúcares

ANOVA: Análise de variância

BHI: Brain Heart Infusion

C': Concentração adicionada de vancomicina amostra

C'': Concentração adicionada de vancomicina referência

CCD: Cromatografia em camada delgada

CLAE – EM: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

CLAE – UV: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CLUE – EM: Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas

CLUE – TQD: Cromatografia líquida de ultra eficiência triplo quadrupolo

CMD: Concentração média determinada

Ct: Concentração teórica de vancomicina referência adicionada

DP: Desvio padrão

DPR: Desvio padrão relativo

ELSD: Detector evaporativo com espalhamento de luz

F: Fator de cauda

HPLC: High performance liquid chromatography

IC: Inclinação da curva de calibração

IV: Espectrofotometria na região do infravermelho médio

k: Fator de retenção

KBr: Brometo de potássio

LC – EM: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina

N: Pratos teóricos

PBS: Tampão fosfato salino

PLP: Proteína ligante de penicilina

r: Coeficiente de correlação

R^2: Coeficiente de determinação

Rf: Fator de retenção

SA: *Staphylococcus aureus*

SQR: Substância Química de Referência

TFA: Ácido Trifluoracético

t_R: Tempo de retenção

TSA: Ágar triptona soja

TSB: Caldo triptona soja

UFC: Unidades formadoras de colônias

UV: Espectrofotometria na região do ultravioleta

VISA: Staphylococcus aureus intermediários à vancomicina

VRE: Enterococcus sp resistentes à vancomicina

VRSA: Staphylococcus aureus resistentes à vancomicina

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE EQUAÇÕES
LISTA DE ABREVIATURAS
1. **INTRODUÇÃO** 22
2. **OBJETIVOS** 24
2.1. Objetivos gerais 24
3. **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** 25
3.1. Histórico 25
3.2. Vancomicina 25
3.3. A célula bacteriana 26
3.4. Relação estrutura e atividade 27
3.4.1. Resistência bacteriana 30
3.4.2. Biodisponibilidade 31
3.4.3. Efeitos adversos 32
3.5. Métodos analíticos 32
4. **ASPECTOS GERAIS DO FÁRMACO** 63
4.1. Substância química de referência 65
4.2. Forma farmacêutica 65
5. **ANÁLISE QUALITATIVA** 66
5.1. Características físicas 66
5.1.1. Material 66
5.1.2. Método 66
5.1.3. Resultado e discussão 66
5.2. Determinação de peso médio 66
5.2.1. Material 66
5.2.2. Método 66
5.2.3. Resultado e discussão 67
5.3. Determinação da faixa de fusão 69
5.3.1. Material 69
5.3.2. Método 69
5.3.3. Resultado e discussão 70
5.4. Cromatografia em camada delgada 71
5.4.1. Material 71
5.4.2. Método 71
5.4.3. Resultado e discussão 73
5.5. Espectrofotometria na região do UV 74

5.5.1. Material 74
5.5.2. Método 75
5.5.3. Resultado e discussão 75
5.6. Espectrofotometria na região do infravermelho 78
5.6.1. Material 78
5.6.2. Método 78
5.6.3. Resultado e discussão 78
5.7. Cromatografia líquida de alta eficiência 80
5.7.1. Material 80
5.7.2. Método 81
5.7.3. Resultados e discussão 83
6. **ANÁLISE QUANTITATIVA** 85
6.1. Introdução 85
6.2. Parâmetros da validação 85
6.2.1. Seletividade 85
6.2.2. Linearidade 85
6.2.3. Faixa de trabalho 86
6.2.4. Limite de detecção (LD) 86
6.2.5. Limite de quantificação (LQ) 86
6.2.6. Precisão 87
6.2.7. Exatidão 87
6.2.8. Robustez 88
6.3. Espectrofotometria na região do UV 89
6.3.1. Material 89
6.3.2. Curva de Ringbom 89
6.3.3. Método 89
6.3.4. Validação 89
6.3.5. Resultados 93
6.3.6. Discussão 103
6.4. Espectrofotometria na região do infravermelho 105
6.4.1. Material 105
6.4.2. Método 105
6.4.3. Validação 106
6.4.4. Resultados 108
6.4.5. Discussão 112
6.5. Cromatografia líquida de alta eficiência 114
6.5.1. Material 114

6.5.2. Método 114
6.5.3. Validação 115
6.5.4. Resultados 118
6.5.5. Discussão 125
6.6. Ensaio microbiológico 126
6.6.1. Material 126
6.6.2. Método 127
6.6.3. Resultados e discussão 128
6.6.4. Validação 130
6.6.5. Resultados 132
6.6.6. Discussão 135
7. **ANÁLISE COMPARATIVA** 137
8. **CONCLUSÕES** 142
REFERÊNCIAS 144

1. INTRODUÇÃO

Os glicopeptídeos são uma importante classe de substâncias antimicrobianas que possui como mecanismo de ação a interferência na formação da parede celular bacteriana (KAHNE et al., 2005; WRIGHT et al., 2015), o que leva à morte celular. Entretanto, o uso indiscriminado deste antibiótico levou ao surgimento de *Enterococcus sp* resistentes à vancomicina (VRE) e *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (VRSA), por isso, atualmente é reservado ao tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas como os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e em casos de endocardite causada por *Enterococcos sp* (KAHNE et al., 2005; WRIGHT et al., 2015).

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídico natural que foi desenvolvido com o objetivo de tratar infecções causadas por *Staphylococcus* resistentes à penicilina (LEVINE, 2006). Apresenta-se como um pó cristalino branco ou quase branco, higroscópico, facilmente solúvel em água e ligeiramente solúvel em etanol (JP, 2011). Foram reportados seis valores de pKa para este fármaco, sendo apenas um deles ácido, em torno de 2,18 (TAKÁCS-NOVÁK, 1993).

Devido ao seu uso restrito e em casos de infecções graves, é importante garantir que o medicamento seja seguro para o paciente e que o mesmo apresente sua função especificada, assim, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos de análise que assegurem estas características. Muitos métodos foram encontrados na literatura, principalmente aqueles que envolvem Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e microbiológicos e, em menor quantidade, métodos espectrofotométricos. Apesar de já existirem muitos métodos validados e eficientes, a busca pela preservação do meio ambiente, além da manutenção da saúde do operador e a redução de gastos tem crescido nos dias de hoje e, portanto, o uso da Química Analítica Verde é uma abordagem necessária para os dias atuais.

Neste trabalho foi realizada uma revisão da literatura de todos os métodos analíticos para a vancomicina com uma análise crítica quanto às condições estabelecidas relacionadasaos princípios da Química Analítica Verde, ao mesmo tempo em que foram desenvolvidos quatro métodos de análise para este fármaco sendo estes: Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e infravermelho médio (IV), CLAE e método microbiológico turbidimétrico. As técnicas desenvolvidas foram validadas e buscaram, através da análise de todos os métodos mais encontrados na literatura, torná-los quimicamente mais ecológicos, reduzindo a geração de resíduos e, desta forma, minimizando os impactos causado ao meio ambiente, além de buscar alternativas mais rápidas, de baixo custo, fáceis de serem realizadas, seguindo os princípios da

Química Analítica Verde. Anteriormente à validação dos métodos, foi feita a análise qualitativa porpeso médio, faixa de fusão, cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do UV e IV, CLAE e turbidimetria, para garantir a identificação do fármaco de estudo e as melhores condições para as análises posteriores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e validação métodos analíticos para vancomicina pó liofilizado para solução injetável, utilizando CLAE, espectrofotometria na região do UV e IV e análise microbiológica através de método turbidimétrico, aplicando-se os princípios da Química Analítica Verde.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Histórico

Com o surgimento de microrganismos resistentes à penicilinas, principalmente da espécie *Staphylococcus*, por volta de 1950 haviam poucas opções para o tratamento de infecções causadas por estes microrganismos, o que levou a busca por novas substâncias que apresentassem capacidade de promover a morte destas células bacterianas, e curar as infecções (LEVINE, 2006).

O primeiro antibiótico glicopeptídico foi descoberto em 1952, quando um missionário de Borneo enviou amostras de lama deste local para o Dr. Kornfield, que isolou um microrganismo *Streptomyces orientalis*, produtor de uma substância ativa contra microrganismos Gram-positivos, incluindo os resistentes à penicilina. Esta substância foi posteriormente testada em animais e purificada para sua aplicação em humanos, sendo este o primeiro antibiótico glicopeptídico, totalmente natural, denominado vancomicina (LEVINE, 2006).

3.2. Vancomicina

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídico de fórmula molecular $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$ e massa molar igual a 1449,27 g/mol. Atua contra microrganismos Gram-positivos, incluindo *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Também é utilizado para o tratamento de infecções em indivíduos alérgicos a penicilinas (VILA et al., 2007). Atualmente é reservada para o tratamento de infecções severas causadas por microrganismos resistentes como os MRSA (WRIGHT et al., 2015) e para o tratamento de infecções intestinais causadas por *Clostridium difficile* (MATZKE; ZHANEL; GUAY, 1986).

O mecanismo de ação da vancomicina é baseado na ligação desta aos resíduos D-Ala-D-Ala, inibindo, assim, a transpeptização nas etapas finais da síntese do peptideoglicano (LAZAR; WALKER, 2002; KANG, et al., 2015). A estabilização desta ligação ocorre via forças de van der Waals e cinco interações de hidrogênio, desta forma não há a ligação entre os peptideoglicanos, levando à morte celular por lise osmótica (WILLIAMS; BARDSLEY, 1999). Portanto, a vancomicina apresenta atividade contra microrganismos Gram-positivos. Devido ao seu mecanismo de ação ser diferente da maioria dos demais antibióticos, ou seja, seu alvo de ligação não consiste em uma proteína específica ou algum ácido nucleico, isso faz com que a bactéria tenha dificuldade em promover mutações genéticas únicas, por isso, a vancomicina

permanece ativa até os dias de hoje (OKANO; ISLEY; BOGER, 2018; JAMES et al., 2013). A Figura 1 evidencia a região de ligação da vancomicina ao resíduo terminal D-Ala-D-Ala.

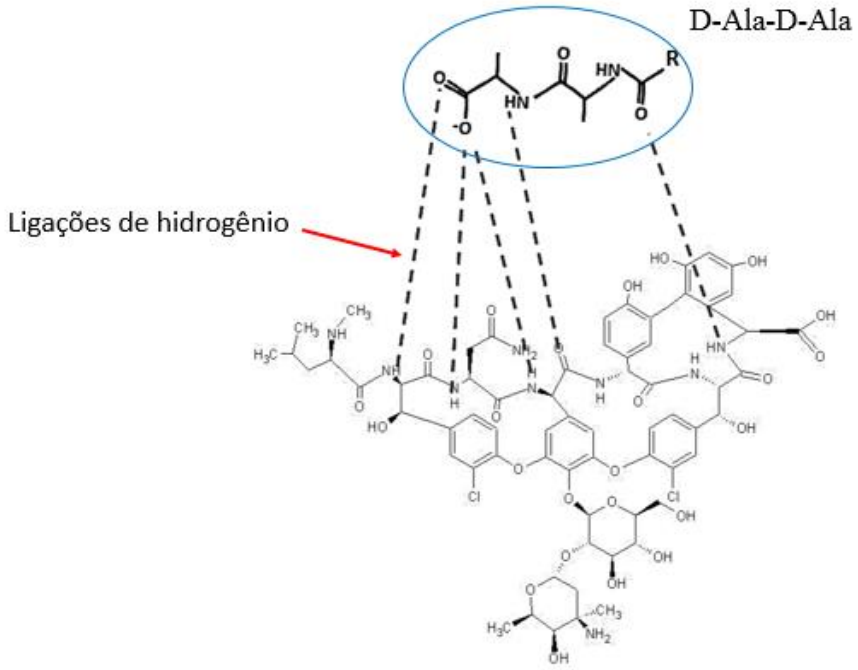

Figura 1. Mecanismo de ação da vancomicina, mostrando as regiões de ligação de hidrogênio da molécula do fármaco com o resíduo D-Ala-D-Ala.

(Fonte: Elaborada pela autora)

3.3. A célula bacteriana

As bactérias são microrganismos unicelulares que podem conviver com os seres humanos trazendo-lhe benefícios, a exemplo da microbiota intestinal. Podem habitar nosso organismo sem causar qualquer tipo de enfermidade (SANTOS, 2004).

A parede celular bacteriana deve ser totalmente intacta para a sobrevivência, sendo um importante alvo para muitos fármacos antimicrobianos (LAZAR; WALKER, 2002). Para isso é necessário conhecer o funcionamento da parede celular. A Figura 2 apresenta um desenho esquemático da estrutura da parede celular das bactérias.

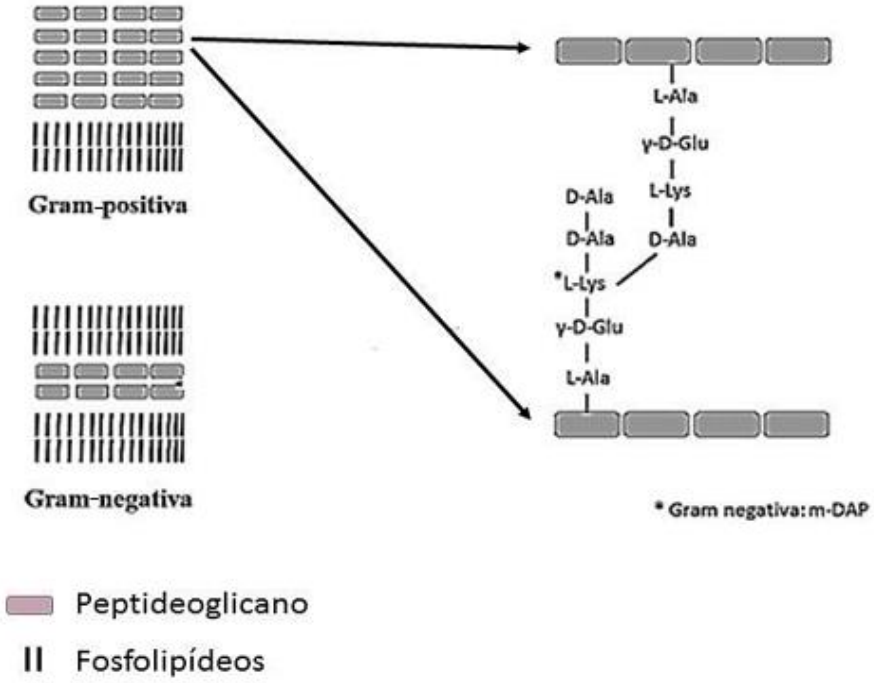

Figura 2. Composição da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

(Fonte: Elaborada pela autora)

A estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas é menos organizada do que a das Gram-negativas. Os dois tipos de bactérias apresentam uma camada de fosfolipídeos interna, formando a membrana celular que irá separar o citoplasma do exterior da célula. Ambas também apresentam o espaço periplasmático, logo em seguida da membrana celular. Nas Gram-positivas a camada de peptideoglicano vem logo em seguida ao espaço periplasmático, sendo esta mais espessa, o que a torna mais sensível à alguns antibióticos, já que muitas substâncias antimicrobianas têm como alvo essa estrutura celular. Nas Gram-negativas, por outro lado, a camada de peptideoglicano é muito mais delgada e, além disso, há a presença de uma membrana externa, também formada por fosfolipídeos. Esta membrana externa, faz com que as células sejam mais resistentes às substâncias antimicrobianas, pois estas não conseguem alcançar a camada de peptideoglicano (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

3.4. Relação estrutura e atividade

A estrutura fundamental dos antibióticos glicopeptídicos consiste em um núcleo heptapeptídico, que apresenta alto grau de homologia com os aminoácidos 2 e 4 ao 7. Os aminoácidos 1 e 3 (AA1 e AA3), na maioria dos antibióticos glicopeptídicos, são aminoácidos aromáticos. A Figura 3 apresenta a estrutura fundamental dos antibióticos glicopeptídicos.

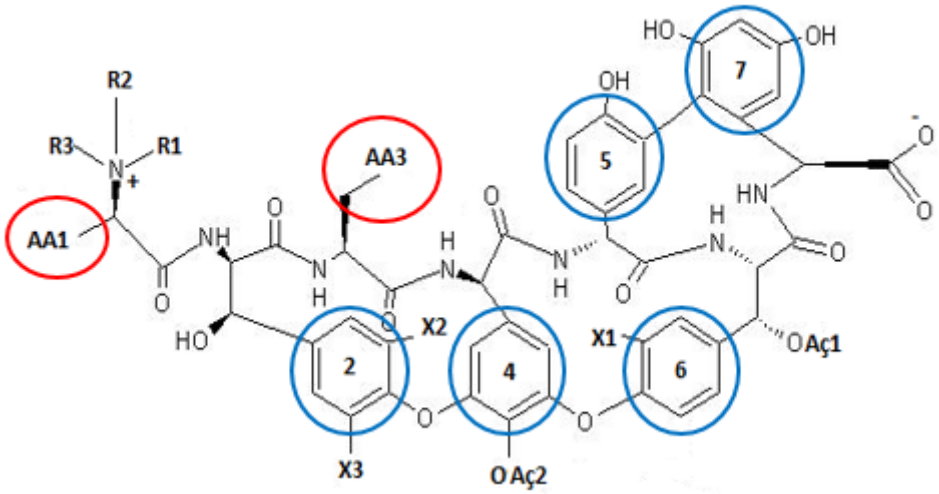

Figura 3. Estrutura fundamental dos antibióticos glicopeptídicos com os aminoácidos alifáticos (em vermelho) e aromáticos (em azul).

Em que:

R1, R2 e R3: representa H ou CH_3;

X1, X2 e X3: representa H ou Cl;

Aç1 e Aç2: açúcares

Números 1 a 7: aminoácidos (começando pelo N-terminal);

AA1 e AA3: aminoácidos 1 e 3, respectivamente.

A relação estrutura e atividade (REA) da vancomicina será detalhada abaixo:

Aminoácido 1: Para a vancomicina, este aminoácido é alifático, sendo normalmente uma leucina ou seu análogo metilado, e sua remoção leva à perda total da atividade bactericida da vancomicina (NAGARAJAN et al., 1993; KANG et al., 2015).

Aminoácido 2: O aminoácido 2 apresenta um átomo de cloro no anel aromático. A remoção deste átomo de cloro leva à formação da monodesclorovancomicina, reduzindo a atividade da vancomicina pela metade (NAGARAJAN et al., 1993; KANG et al., 2015). A presença de átomos de cloro nos aminoácidos 2 e 6, assim como a estrutura macrocíclica desta molécula, faz com que a mesma assuma uma configuração de baixa energia (ASHFORD; BEW, 2012).

Aminoácido 3: Este aminoácido também é alifático e está representado pela asparagina. A mudança deste aminoácido por uma glutamina leva à redução da atividade da vancomicina. Algumas formas naturais análogas à vancomicina possuem um aminoácido

aspartato ao invés de asparagina, levando à uma redução de até dez vez na atividade da vancomicina, isso se deve a presença de cargas negativas próximas ao local de ligação e a alteração da conformação geométrica, que "esconde" o terminal carboxílico acil-D-ala-D-ala (NAGARAJAN et al., 1993; KANG et al., 2015).

Aminoácido 4: Em glicopeptídeos semelhantes à vancomicina o grupo hidroxila ligado ao fenol possui um dissacarídeo ligado, geralmente o primeiro açúcar é uma D-glicose ligada por ligação β-glicosidica, e o segundo açúcar é uma L-vancosamina, ligada a glicose por uma ligação α-glicosídica. A remoção da vancosamina reduz a atividade do glicopeptídeo de duas a cinco vezes. A remoção do segundo açúcar mantém a atividade apenas *in vitro*, enquanto que a *in vivo* também é reduzida a cinco vezes (NAGARAJAN et al., 1993; ASHFORD; BEW, 2012; KANG et al., 2015).

Aminoácido 6: A remoção do átomo de cloro do aminoácido 6 apresenta pequena ou nenhuma redução da atividade da vancomicina, entretanto, a remoção deste mesmo átomo do aminoácido 2 reduz em dez vezes a atividade deste fármaco. A presença do açúcar L-4-epi-vancosamina no aminoácido 6, aumenta a atividade da vancomicina em duas a cinco vezes (NAGARAJAN et al., 1993; KANG et al., 2015).

Aminoácidos 5 e 7: Não há análogos naturais ou modificados que apresentem alterações nos aminoácidos 5 e 7, entretanto, o grupo carboxílico no aminoácido 7 oferece uma oportunidade de modificação química (NAGARAJAN et al., 1993; KANG et al., 2015).

Na Figura 4 estão destacados pelas setas em vermelho os grupos substituintes da vancomicina.

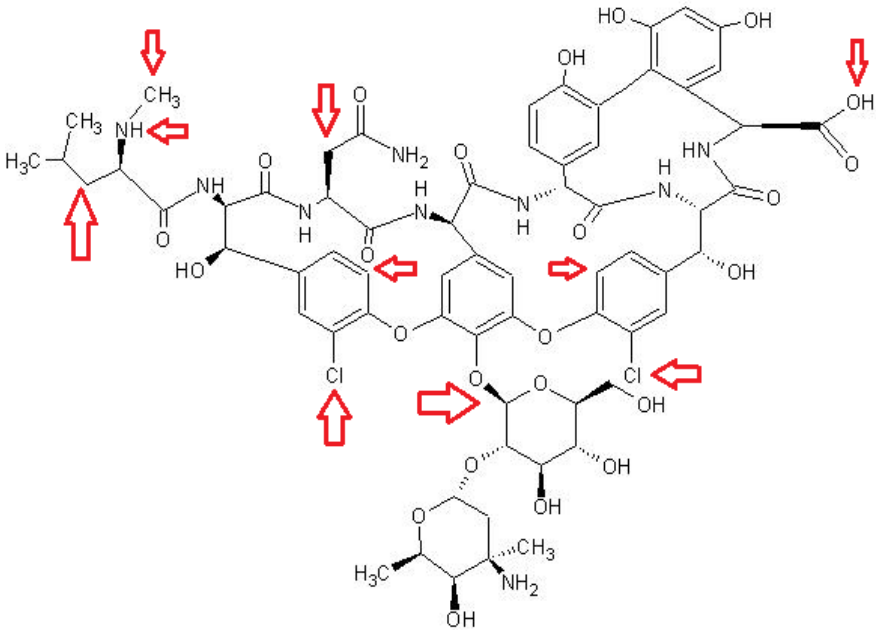

Figura 4. Estrutura da vancomicina (CAS – 1404-90-6), em destaque, pelas setas, os grupos substituintes.

3.4.1. Resistência bacteriana

A vancomicina foi, inicialmente, empregada para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina, dando espaço posteriormente a fármacos menos tóxicos, como a teicoplanina (JONES, 2006). Desde o surgimento dos MRSA, a vancomicina se tornou o único tratamento efetivo contra estes microrganismos (SMITH et al., 1999).

Devido ao amplo uso deste fármaco, em 1988 surgiram os primeiros casos de resistência em enterococos (UTTLEY et al., 1988). O principal mecanismo de resistência desenvolvido por enterococos está na síntese da parede celular. O transposon (Tn1546) codifica uma dehidrogenase (VanH) que reduz o piruvato a D-Lactato (D-lac) e uma ligase de grande especificidade ao substrato (VanA) que catalisa a formação de uma ligação éster entre D-Ala e D-Lac, que irá substituir o resíduo D-Ala-D-Ala, eliminando uma das ligações de hidrogênio entre o fármaco e o resíduo (ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996). Para que a resistência seja detectável e significante é necessária ação de diversas enzimas, então a bactéria precisa sintetizar D-Lac (VanH) ou D-Ser (VanT) e D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser, e degradar D-Ala-D-Ala (VanX) ou remover D-Ala-D-Ala dos precursores (VanY) ou ambos (VanXY),

ainda, um sistema de regulatório (VanS-VanR) que resulta na indução pela vancomicina (BAMBEKE et al., 2004).

S. aureus intermediários à vancomicina (VISA) são caracterizados pelo aumento da espessura de sua parede celular, a produção de material extracelular mal caracterizado e reduzida capacidade de divisão (HAMILTON-MILLER, 1999). Isso ocorre devido ao aumento de resíduos de D-Ala-D-Ala livres, que se ligam à molécula de vancomicina e impedem que esta alcance seu alvo (BAMBEKE et al., 2004). Ainda pode ser atribuída a resistência à diminuição da atividade de proteínas ligantes de penicilinas (PLPs) (CUI et al., 2000) ou alterações de precursores de mureína (SIERADZKI; TOMASZ, 1999). Mas ainda há muitas mutações aditivas que ocorrem e podem conferir o desenvolvimento de resistência (BAMBEKE et al., 2004).

3.4.2. Biodisponibilidade

A vancomicina apresenta baixa absorção pelo trato gastrointestinal, por isso é administrada por infusão intravenosa para tratamento de infecções sistêmicas (ARMSTRONG; WILSON, 1995; VANCOCINA®CP, 2014). A via intramuscular não é recomendada devido à forte dor que causa e o desenvolvimento de necrose muscular (PIGRAU; ALMIRANTE, 2009). O fármaco deve ser reconstituído em água para injetáveis e a diluição em solução de cloreto de sódio 0,9 %, glicose 5,0 % ou solução de Ringer Lactato e a infusão não deve ultrapassar 10 mg/minuto (VANCOCINA®CP, 2014). A sua eliminação é majoritariamente via renal, quando administrado intravenosamente. No tratamento de diarréias causadas por *Clostridium difficile* poderá ser realizada administração por via oral (PIGRAU; ALMIRANTE, 2009). Entretanto, para pacientes com reduzida função renal ou com colite pseudomembranosa, observa-se concentrações plasmáticas potencialmente tóxicas (MATZKE; ZHANEL; GUAY, 1986; ARMSTRONG; WILSON, 1995; YAMAZAKI et al., 2017). A vancomicina não penetra o líquido cerebrospinal íntegro, mas, estudos demonstraram a presença deste fármaco em casos de meningites (GUMP, 1981; BEACH et al., 2017).

A dosagem usual para um adulto, com funções renais normais, deve ser de 1g (10 a 15 mg/kg) a cada 12 horas, administrada por infusão intravenosa durante no mínimo 60 minutos, sendo desejável que a concentração plasmática seja menor que 50 µg/mL, pois concentrações acima desta estão relacionadas à ototoxicidade (VANCOCINA®CP, 2014). Pacientes com reduzida função renal podem vir a desenvolver ototoxicidade devido ao aumento da concentração plasmática da vancomicina.

3.4.3. Efeitos adversos

A ototoxicidade é um efeito adverso importante da vancomicina, e é caracterizada por danos ao nervo auditivo, inicialmente afetando os pelos sensoriais de alta frequência na cóclea, e então os de média e baixa frequência, podendo levar a perda total da audição (BAILIE; NEIL, 1988). Outro efeito adverso causado pela vancomicina é a nefrotoxicidade. Há alguns anos atrás a ocorrência deste efeito era mais comum, possivelmente devido às impurezas durante a produção (PIGRAU; ALMIRANTE, 2009). Entretanto, sabe-se que o uso deste fármaco associado a outros fármacos conhecidamente nefrotóxicos, principalmente aminoglicosídeos, aumenta as chances de efeitos adversos associados à nefrotoxicidade (RYBAK et al., 1990; PIGRAU; ALMIRANTE, 2009). Ainda, há um estudo que relata a associação entre a vancomicina e cilastatina sódica, sendo que esta última é capaz de reduzir ou eliminar o efeito nefrotóxico da vancomicina (TOYOGUCHI et al., 1997).

Dentre outros efeitos adversos encontram-se a Síndrome do homem vermelho, caracterizada pelo desenvolvimento de prurido e eritema, acompanhado ocasionalmente de hipotensão, podendo levar à parada cardíaca, mas, esta síndrome é apenas causada quando a vancomicina é administrada por infusão rápida (PIGRAU; ALMIRANTE, 2009). A ocorrência de flebite pode ocorrer quando administrada por uma via periférica (PIGRAU; ALMIRANTE, 2009).

3.5. Métodos analíticos

O desenvolvimento de métodos de análise é parte fundamental do processo de produção para a indústria farmacêutica. É através destes métodos que a garantia da qualidade do medicamento é assegurada. Outro fator que tem sido adicionado ao desenvolvimento de métodos analíticos é a preocupação com o meio ambiente, seguindo os preceitos que compreendem à Química Analítica Verde.

A vancomicina é um antibiótico amplamente estudado desde a sua descoberta, o que justifica o grande volume de métodos de análise encontrados para este fármaco. Devido a este grande número, neste trabalho foram considerados apenas os trabalhos publicados a partir dos anos 2009, compreendendo a última década.

Observou-se que dentre os métodos encontrados para este fármaco, não houve nenhum método que atendia aos requisitos da Química Analítica Verde. Os trabalhos encontrados na literatura, que compreendem os últimos dez anos, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
Microbiológico	Difusão em discos; Microrganismo: *Bacillus subtilis* ATCC 6051. Meio 2 BD DifcoTM e 20 mL foram adicionados em 2 mL de inóculo a 3×10^8 UFC/mL	Halos de Inibição	Pó liofilizado para injeção	Aguilera-Correa et al., 2018
Microbiológico	Microrganismo: *S. aureus* 15981, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. As bactérias foram suspensas e diluídas em PBS ou SS, alcançando 10^8 UFC/mL, 5 mL deste inóculo foi encubado com discos em Ti-6Al-4V NT (37ºC/24 h). Após a incubação, os discos foram lavados três vezes com PBS ou SS para remover bactérias que não aderiram. Finalmente, os discos foram colocados com o kit de viabilidade bacteriana Live/Dead Backlight® e lavada com água estéril	Adesão bacteriana	Camada anódica nanotubular de TiO_2	Aguilera-Correa et al., 2018
CLAE	Coluna: X-Terra RP-18 (150 x 5 mm). FM: acetonitrila : água (10:90, v/v), Vazão: 1 mL/min. O volume de injeção foi de 40 µL e t_R de 2,6 min.	227 nm	Camada anódica nanotubular de TiO_2	Aguilera-Correa et al., 2018

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE – EM	Coluna: Poroshell 120 EC-C18 (150 x 2,1 mm, 2,7 µm). FM: A: ácido fórmico 0,1% e FM B: acetonitrila que operou em modo gradiente: 0–1 min, 5% B; 1–9 min, 5–10% B; 9–14 min, 10–45% B; 14–20 min, 45–90% B; 20–25 min, 90 % B para lavar a coluna; 25–25,1 min, 90–5 % B; 25,1–30 min, 5% B para equilibrar a coluna.Vazão: 0,4 mL/min.	*m/z* 144,1019 – 1305,3428	Microssoma de fígado de rato, água e PBS	Cao et al., 2018
Mirobiológico	Microrganismo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Placas com ágar Mueller–Hinton foram submetidas a swab uniformemente com 3 mL de suspensão bacteriana (≈$1 \cdot 10^8$ UFC/mL). O excesso foi removido. Coágulo de plasma com antimicrobiano foram adicionados na superfície e encubado (18h/37°C).	Halos de inibição	Coágulo de plasma	Gessmann et al., 2018
CLAE	Coluna: Waters XSELECT HSS 18 (100 x 4,6 mm, 3,5 µm). FM: ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v) e FM B 95:5 (v/v) acetonitrila: TFA 0,1%, eluição gradiente, onde a fase móvel B aumentou de 0% a 15% em 8 min. Vazão: 1 mL/min.	210 nm	Coágulo de plasma	Gessmann et al., 2018

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: Supelcosil C18 (150 × 4,6 mm, 2,7 µm). FM: solução tamponante acetato de amônio 20 M ajustada com ácido fórmico para pH 4,0: metanol (88:12, v/v).Vazão: 1,5 mL/min.	240 nm	Plasma humano	Lima et al., 2018
CLAE	Coluna: Agilent ZORBAX SB-C18 (150 × 4,6 mm; 5 µm). FM: água com ácido fórmico 0,1 %: acetonitrila com ácido fórmico 0,1% (70:30). Vazão: 0,5 mL/min.	*m/z* 725.8 - 144.2	Soro humano	Liu et al., 2018
CLAE	Coluna: SYMMETRY C8 (150 x 3,9 mm). FM: ácido heptanosulfônico 0.01 M e acetonitrila (85/15, v/v). Vazão 1,4 mL/min.	280 nm	Membrana nanofibrosa	Liu et al., 2018
CLAE – ELSD	Coluna: Phenomenex Kinetex Biphenyl (50 × 4,6 mm, 5 µm). FM: metanol (A) e solução aquosa de acetato de amônio 5 M contendo ácido fórmico 0.1% (B). A eluição gradiente: 0–1 min, 15% A; 1–17 min, 15–50% A; 17–25 min, 50% A; 25–27 min, 50–75% A; 27–37 min, 75% A; 37–38 min, 75–15% A; 38–40 min, 15 %A. Vazão: 0,5 mL/min.	As condições do detector ELSD foram: gás nebulizador 20 psi;temperatura do drift-tube, 55 °C.	Ração animal	Song et al., 2018

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
LC - EM	Coluna: Zorbax Eclipse Plus C18 (50 × 2.1 mm, 5 µm).FM: água contendo ácido fórmico 25 mM para A e acetonitrila modificada com o mesmo eletrólito para B. A eluição gradiente : nos primeiros 0,1 min, B foi mantido a 1%; Então B aumentou para 40% em 0,01 min; de 0,11 a 2 min, B foi eventualmente aumentando para 100%, depois disso, B declinou rapidamente para 1% em 0,01 min. mantido por 3,99 min. Vazão: 0,4 mL/min.	*m/z* 481,1→396,0	Plasma humano	Chen et al., 2017
CLAE – EM	Coluna: Phenomenex Luna C18 (150 × 1 mm). FM: solução aquosa de 20% metanol com 0,05% ácido trifluoroacético.	*m/z* 1450	Cimento ósseo	Frew et al., 2017
CLUE – EM	Coluna: MeteoricCore C18 Bio (100 x 4,6 mm, 2,7 µm) e uma coluna de guarda ULTRA, UHPLC C18. FM: água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos contendo ácido fórmico 0,1%. A eluição gradiente foi: 100% a 88% do solvente A foi usado por 0,8 min e a composição de 88% A foi mantido isocrática até 1,8 min. De 70 a 50% do solvente A foi aplicado até 1,8 min. Vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção: 3 µL.	Monitoramento de reação múltipla	Soro humano, urina e fluídos peritoneais e pleurais	Javorska et al., 2017

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: Kinetex Biphenyl 100 A (50 × 3 mm, 2,6 µm) com coluna de guarda UPLC (3-mm ID). FM: água (A) contendo ácido fórmico e acetonitrila (B). A eluição gradiente foi: A 100% de 0 – 5 min; 70:0, 5-8 min.; 100 % A 8 a 10 min. Vazão: 0,5 mL/min	198 nm	Plasma e tecido renal de ratos	Joshi et al., 2017
CLUE – EM	Coluna: BEH C18 Waters (50 x 2,1 mm, 1,7 µm). FM: A - ácido fórmico 0,1% em água e B - ácido fórmico 0,1% em metanol. A eluição gradiente foi: 90% A, 0-0,5 min; 75% A, 0,5 a 1,6 min; 10 % A; 1,6–2,5 min, 10 % A; 2,5–2,6 min, 90 % A; 2,6–3,5 min. Vazão: 0,4 mL/min.	*m/z* 725,5 > 144,1	Fluído cerebroespinal	Mei et al., 2017
CLAE	Coluna: Kinetex biphenyl (50 x 3 mm, 2,6 µm). FM: acetonitrila e água com 0,1% ácido fórmico.	198 nm	Plasma de ratos	O'Donnell et al., 2017
CLAE	Coluna: Optimal® C8 (250 x 4,6 mm;5 µm). FM: solução tamponante citrato (pH 4,0): acetonitrila: metanol (85: 10: 5, v/v/v). Vazão: 1,0 mL/min.	280 nm	Pó liofilizado para injeção injetável	Serri et al., 2017

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: Grace Alltima RP-18 (100 × 3 mm, 3 µm). FM: acetonitrila: água (90:10, v/v) (A) e água com ácido fórmico 0,1% (B). A eluição gradiente foi: 0 a 1,0 min, 5 % A; 1,0 a 9,0 min, aumento para 50 % A; 9,0 a 15,0 min, aumento para 85 % A; e 15, a 20,0 min, 85 % A. Vazão: 0,3 mL/min.	234 nm	Água de rejeitos	Soran et al., 2017
CLAE	Coluna: Acclaim 120 C18 RP (250 x 4,6 mm; 5 µm). FM: solução de solução tamponante fosfato de potássio 50 mM em ácido fórmico 0,1 %: acetonitrila (90:10).	235 nm	Osso, músculo e plasma de ratos	Working et al., 2017
CLAE – EM	Coluna: Hypersil GOLD aQ C18 (50 × 2,1 mm; 1,9 µm). FM: A: ácido fórmico 0,1 % em água e B: acetonitrila. A eluição gradiente foi: B alcançar 100 % em 1,5 min em vazão de 400 µL/min, então a coluna foi lavada com 100% B por 0,5 min. E reacondicionada a 98% por 1 min.	*m/z* 724,8→100,0, 143,8	Plasma humano	Barco et al., 2016
Microbiológico	Microrganismo: *Staphylococcus aureus* 65389. Método de difusão em discos foi realizado em meio nutriente. O eluente de membrana (8 µL) foi pipetado em discos absorventes	Halos de inibição	Membrana nanofibrosa	Chou et al., 2016

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: Spherisorb C18 ODS (150 x 4,6 mm; 5 µm) acoplada à coluna de guarda µBondapak C18 10 µm. FM: solução tamponante fosfato de amônio 0,05M com 11% de acetonitrila.	240 nm	Membrana nanofibrosa	Chou et al., 2016
Microbiológico	Aliquotas de 100 µL de vancomicina solução de referência (concentrações de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, e 1,0 mg/L) e amostra (1 mg/L) foram transferidas para uma microplaca e 100 µL de TSB inoculado com *B. subtilis* (ATCC 6633) em uma proporção de 5%.	630 nm	Pó liofilizado para solução injetável	Francisco et al., 2016
Microbiológico	*B. subtillis* (ATCC 6633). A suspensão foi colocada em placas. Discos de papel previamente imergido em soluções de vancomicina referência (6,4, 8,0, 10,0, 12,5, e 15,6 mg/L) ou soluções amostra (10,0 mg/L) foram colocadas na superfície da camada semeada	Halos de inibição	Pó liofilizado para solução injetável	Francisco et al., 2016
Microbiológico	Microrganismo: *S. aureus* (ATCC 65389). O Eluente de membrana (8 µL) foi pipetado em discos absorventes de 6 mm, e então os discos foram colocados em placas com ágar nutriente. Uma solução do fármaco de 50 µg/mL foi utilizada como concentração de referência.	Halos de inibição	Nanofibras biodegradáveis	Hsu et al., 2016

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: Titan C18 (100 x 2,1 mm; 1,9 µm). FM: A: acetato de amônio 50 mM em água pH 8,0 e B: água: metanol (65:35, v/v), na vazão de 0,15 mL/min. A eluição gradiente foi: inicialmente 50% B; rampa para 65% B; rampa para 100% B de 15 a 20 min; re-equilibrar para 50% B por 5 minutos.	280 nm	Solução de referência de vancomicina	Kirk et al., 2016
CLAE	Coluna: Acclaim 120 C18 fase reversa (250 x 4,6 mm; 5 µm). FM: solução de solução tamponante fosfato de potássio 50 mM (90:10) em 0,1% ácido fórmico:acetonitrila.	235 nm	Osso, múusculo e plasma de ratos	Loc-Carillo et al., 2016
CLAE	Coluna: Dikma Diamonsil C18 (250 x 4,6 mm, 5µm). FM: ácido heptasulfônico 0,01 M: acetonitrila (85:15, v/v). Vazão: 1,0 mL/min.	280 nm	Microesferas, plasma, ossos e músculo de coelhos	Mao et al., 2016

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
Microbiológico	Vancomicina fortificada (25 mg/mL) foi diluída em 1:1000 (40, 20 e 5 µg/mL). TSB foi inoculado com uma suspensão bacteriana (aproximadamente 6 x 10^8 UFC/mL) de *B. subtilis* (cepa J3958). Um volume de 0,1 mL dessa suspensão foi adicionada a 25 mL de Heart Infusion agar e colocado em placas de petri. Orifícios foram feitos no agar e 10 µL do antibiótico foram adicionados. Foram feitas duas placas para o ensaio (A e B) para cada antibiótico e em cada temperatura (4, 24, e 35°C) em cada dia de amostragem (dias 0, 7, e 14).	Halos de inibição	Pó liofilizado adicionado em lágrimas artificiais	Montes et al., 2016
CLAE – EM	Coluna: Merck SeQuant zicHILIC (20 x 2,1 mm, 5,0 µm). FM: A- ácido fórmico 0,1 % em água e B- ácido fórmico 0,1% em acetonitrila, em eluição gradiente	Íon alvo: *m/z* 725.6 – 144.1 Íon de referência: *m/z* 746.1 – 144.2	Plasma humano	Parker et al., 2016

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: Kinetex biphenyl (50 x 3 mm, 2,6 µm). FM: acetonitrila e água contendo 0,1% de ácido fórmico.	198 nm	Plasma de ratos	Rhodes et al., 2016
CLAE – EM	Coluna: Grace Alltima C18 (100 × 3 mm, 3 µm). FM: acetonitrila: água (A) e 0.1% ácido fórmico (B) (90:10, v/v). A eluição gradiente foi: 0 a 1,0 min, 5 % A; 1,0 a 9,0 min, aumenta para 50 % A; 9,0 a 15,0 min, aumenta para 85 % A; e 15,0 a 20,0 min, 85% A. Vazão: 0,3 mL/min.	234 nm	Água de superfície	Soran et al., 2016
CLAE	Coluna: Zorbax SB-AQ (250 x 4,6 mm, 5 µm). FM: A: solução tamponante fosfato de potássio 0,05 M (pH 6): acetonitrila: metanol (91:5:4) e B: solução tamponante fosfato de potássio 0,05 M: acetonitrila: metanol (84:8:8). A eluição gradiente foi: 100 % A por 2 min, aumenta para 100 % B por 9 min, e deixa durante 14 min, aumenta para 100% A por 5 min. Vazão: 1,5 mL/min.	210 nm	Compostos nanoestruturados de hidroxiapatita e colágeno	Suchý et al., 2016
CLAE	Coluna: nucleodur C18 (125 × 4,6 mm, 5 µm). FM: solução tamponante fosfato de amônio 50 mM ajustado para pH 2,2 e acetonitrila (88:12, v/v). Vazão: 0,6 mL/min.	205 nm	Plasma humano	Usman et al., 2016

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: Accucore® C-18 HPLC (100 x 2,1 mm; 2,6 µm). FM: (A) água com 0,1% TFA e (B) acetonitrila: agua 40:60 (v/v) com 0,1% TFA. A eluição gradiente foi: 10% B por 0 a 2,0 min; de 2,0 min a 12,0 min, solvente B aumentou para 62,5%; de 12,0 a 14,0 min, solvente B foi reduzido para 10%. Vazão: 0,4 mL/min.	240 nm	Meio de crescimento bacteriano	Wicha et al., 2016
CLAE	Coluna: Luna (150 x 4,6 mm; 5 µm). FM: solução tamponante fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8): acetonitrila (17:3). Vazão: 1,0 mL/min.	210 nm	Pó liofilizado para solução injetável	Berti et al., 2016
CLUE	Coluna: C18 (Kinetex; Phenomenex (100 × 2,1 mm; 1,7 µm). FM: acetonitrila (0% a 15% durante 4 min) em solução tamponante fosfato 10 mM como eluente.	280 nm	Tecido adiposo e subcutâneo e ossos (dialisados) de porcos	Bue et al., 2015
CLAE	Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm). FM: acetonitrila: fosfato de trietil amônio 0,015 M (pH 3,3) (8:92). Ácido fosfórico foi utilizado para ajustar o pH da fase móvel. Vazão: 1,0 mL/min.	230 nm	Urina e plasma humanos	Khalilian et al., 2015

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). FM: solução tamponante fosfato de potássio 30 mM (pH 3,38): acetonitrila (91,5:8,5, v/v). Vazão: 1,1 mL/min.	236 nm	Plasma de fluido cerebrospinal humano	Li et al., 2015
CLAE	Coluna: Symmetry C8 (150 x 3,9 mm). FM: ácido heptasulfônico 0,01 M: acetonitrila (85:15, v/v). Vazão: 1,4 mL/min.	280 nm	Nanofibras	Liu et al., 2015
CLAE	Coluna: Agilent Zobrax SB-C_{18} (250 x 4,6 mm, 5 µm) equipado com coluna de guarda Phenomenex® Security Guard C_{18} KJ0-4282 (4 x 3,0 mm). FM: 100 % acetonitrila (solvente A) e solução tamponante fosfato dehidrogenado de potássio 30 mM ajustado para pH 4,0 com ácido fosfórico/hidróxido de potássio (solvente B). Para urina: 7 % a 17 % solvente A em 10 minutos; 17 % a 50 % solvente A 10-11 minutos, 50 % solvente A 11-16 minutos; 50 % a 7 % solvente A 16-18 minutos; mantém 7 % solvente A até 23 min. A vazão foi de 1,0 mL/min. Para fluido cerebrospinal foi: 7 % a 14 % solvente A em 11 minutos; 14% a 50 % solvente A 11-13 minutos; 50 % solvente A 13-18 minutos; 50 % a 7 % solvente A 18-20 min; 7 % solvente A até 24 minutos. Vazão: 1.0 mL/min	220 nm	Urina e fluido cerebrospinal humano	Lin et al., 2015

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: Mediterranea Sea18 (150 × 4,6 mm; 5 µm). FM: solução tamponante fosfato sódio 20 mM pH 6,9: acetonitrila (88:12, v/v). Vazão: 1,0 mL/min.	280 nm	Scaffolds	Martínez-Vazquez et al., 2015
CLUE – EM	Coluna: Acquity UPLC BEH HILIC (100 × 2,1 mm; 1,7 µm) com coluna de guarda Phenomenex C-18 (100 × 4 mm). FM: acetonitrila A e água B, ambos contendo 0,1% ácido fórmico. A eluição gradiente foi 95% A, diminuindo para 40% A em 2,50 min. Em 2,60 min, A foi 99% e mantido até 4,00 min. de 4,0 a 5,0 min 95% A. Vazão: 0,45 mL/min.	*m/z* 725,2-144,0 e 726,1-144,0	Plasma humano	Oyaert et al., 2015
CLAE	Solvente A foi 5% acetonitrila + 0,1% ácido fórmico e B foi 95% acetonitrila + 0,1 % ácido fórmico. A eluição gradiente foi 0% B por 2 min aumentando para 100% durante 4 min; 100% B foi mantido por mais 2 min depois de rápido reequilíbrio em 100% A. A vazão foi de 0,3 mL/min.	*m/z* 1448,4-1402,2	Miçangas de cálcio	Aiken et al., 2014
CLE	Coluna: Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 4,6 mm; 3,5 µm). FM: acetonitrila: trietilamina 0,1% ajustado para pH 3 com ácido fosfórico (87,5:12,5, v/v).	210 nm	Pó liofilizado para solução injetável	Anderson et al., 2014

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
Microbiológico	Os hidrogéis adesivos foram colocados em PBS por períodos de tempo de 0 a 6 dias e então colocados em placas de cultura uniformemente cobertas por *Staphylococcus aureus* e ágar Lysogeny.	Halos de inibição	Hidrogeis adesivos	Chae et al., 2014
Dissolução	O ensaio foi realizado em 500 mL de 0,1 M HCl por 2 horas, então em solução tamponante fosfato pH 6,8 a temperatura de 37 ± 0,5 °C. A velocidade de rotação foi mantida constante em 100 rpm. 5 mL das amostras foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados de 2, 3, 4, 5, 6, 8, e 24 horas e substituído com meio de dissolução fresco.	281 nm	Comprimidos	Elkhodairy et al., 2014
Microbiológico	Três isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* (SA) foram estudados (SA 11; SA 18 e SA 29). Placas com ágar Mueller-Hinton foram preparados com vancomicina (0,5-128 μg/mL). Por método direto de suspensão de colônia, equivalente a 0,5 McFarland. O inóculo foi preparado em salina de 18 a 24 horas de incubação. A suspensão foi diluída até alcançar a concentração de 10^5 UFC/mL.	Halos	Comprimidos	Elkhodairy et al., 2014

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
Microbiológico	Uma suspensão bacteriana foi preparada de um meio de cultura overnight e transferida para meio Mueller-Hinton e incubada por 2 h a 37º C com *shaker* 150 rpm. Esta cultura foi diluída em 500 mL de solução tamponante salino fosfato pH 6,8 para alcançar um inoculo inicial de 5×10^8 UFC/mL. A quantidade de vancomicina em cada comprimido foi de 100 mg. Alíquotas de 10 mL da cultura bacteriana de cada frasco de dissolução foram tomadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 12, e 24 h de incubação a 37º C. A bactéria foi ressuspensa e diluída em salina estéril e 20 μL de alíquota foi plaqueada em ágar Mueller-Hinton	Contagem de colônias	Comprimidos	Elkhodairy et al., 2014
Microbiológico	Microrganismo: *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Os discos saturados com 20 µL foram colocados em placas com ágar Antibiotic Assay Medium nº 1 impregnadas com 50 mg/L de cálcio e suspensão 0,5 McFarland de organismo de referência.	Halos de inibição	Polimetil-metacrilato	Gálvez-Lopez et al., 2014
CLAE	Coluna: Symmetry C8 (150 mm x 3,9 mm). FM: ácido heptasulfônico 0,01 M: acetonitrila (85/15, v/v). Vazão: 1,4 mL/min.	280 nm	Membrana nanofibrosa	Hsu et al., 2014

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
Microbiológico	Microrganismo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 65389). Método de difusão em discos em meio nutriente. 8 µL do eluente da membrana foi pipetado em discos absorventes de 6 mm.	Halos de inibição	Membrana nanofibrosa	Hsu et al., 2014
2D – LC	LC1 coluna: ASTON C18 (100 x 4,6 mm; 5 µm). FM: Bomba 1: solução de acetato de amônio 10,0 mM (pH 3,8): acetonitrila (90:10, v/v). Vazão: 1,0 mL/min. Coluna de captura: ASTON SCX (20 x 4,6 mm; 5 µm). FM: Bomba 2: acetato de amônio 10 nM (pH 3,0). LC2 coluna: ACR C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). FM: Bomba 3: solução de acetato de amônio 50,0 mM de (pH 5,2): acetonitrila (82,5:17,5, v/v). Vazão:1,2 mL/min.	282 nm	Plasma humano	Li et al., 2014
CLUE - TQD	Coluna: Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm). FM: A: 0,1% (v/v) ácido fórmico em água e B: 0,1% (v/v) ácido fórmico em acetonitrila. A eluição gradiente foi: 95 % eluente A por 1 min, mudou para 60 % por 3 min, mudou para 1 % por 3 min e mudou de volta para 95 % por 3 min. Vazão: 0,3 mL/min. A vazão de dessolvação foi de 750 L/h e fluxo de cone 50 L/h. Vazão: 0,15 mL/min.	*m/z* 725 – 144	Fluído de tecido drenado	Shou et al., 2014

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
LC – EM	Coluna: Fortis C8 (100 × 2,1 mm; 3 µm). FM: A: ácido fórmico 0,1 % (v/v); B: metanol contendo 0,1% ácido fórmico (v/v); A eluição gradiente foi: 100 % A por 3 min, aumento para 30 % B durante 7 min, mantém por 2 min; depois aumento para 80 % B em 1 min, mantém por 2 min. Vazão: 0,3 mL/min.	*m/z*725 - 1306	Soro humano	König et al., 2014
CLAE	Coluna: Vydac C18 (50 mm x 4,6 mm, 3 µm). FM: ácido trifluoroacético 0.1% (v/v) (A) e acetonitrila: TFA 0.1% (B), 95:5 (v/v). A eluição gradiente foi: B aumentando de 0 % a 15 % em 8 min. Vazão: 1 mL/min.	214 nm	Plasma de camundongo	Muppidi et al., 2013
CLAE	Coluna: Prodigy C18 encapada (250 x 4,6 mm; 5 µm). FM: acetonitrila: trietilamina pH 3,0 0,2 % ajustada com ácido fosfórico (08:92, v/v). Vazão: 2 mL/min.	220 nm	Hidrogel com vancomicina	Odgers et al., 2013
CLAE	Coluna: Phenomenex Kinetex XB-C18 (210 x 50 mm; 5 µm). FM: metanol: água e trifluoacetato 0,2 M (6:94; v/v). Vazão: 0,8 mL/min	*a*	Miçangas de cálcio	Roberts et al., 2013
Microbiológico	Discos preenchidos com 20 µL (solução eluída em PBS) foram colocados em placas semeadas com *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e sangue ovino defibrinado TSA.	Halos de inibição	Miçangas de cálcio	Roberts et al., 2013

[a]: Dados não apresentados

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: SYMMETRY C18 (150 x 4,6 mm). FM: formato de amônio 0,01 M: metanol (20/80 v/v). Vazão: 1 mL/min.	210 nm	Sangue, fáscia, crânio e cérebro de ratos	Tseng et al., 2013
CLAE	Coluna: Phenomenex Gemini C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm). FM: água: acetonitrila: trimetilamina: tetrahidrofurano (4500: 300: 7: 50) e pH ajustado com 85% ácido fosfórico para pH 3,0. Vazão: 1,8 mL/min.	280 nm	Pó liofilizado para solução injetável	Whaley et al, 2013
CLAE	Coluna C18 e FM: acetonitrila: acetato de amônio e vazão de 1 mL/min.	214 nm	Cimento ósseo	Amin et al., 2012
CLAE	Coluna: C18 RP Novapak. FM: solução tamponante fosfato de potássio: acetonitrila (90/10, v/v) (pH 2,3), e vazão de 1 mL/min.	229 nm	Hidróxido em camadas	Chakraborti et al., 2012
Microbiológico	Microrganismo: *S. epidermidis* (ATCC 14990). Uma suspensão de *S. epidermidis* (10^8 UFC/mL) foi espalhada em placas de ágar Mueller–Hinton.	Halos de inibição	Hidróxido em camadas	Chakraborti et al., 2012
CLAE	Coluna: SYMMETRY C8 (150 mm x 3,9 mm). A fase móvel consistiu em ácido heptasulfônico 0.01 M: acetonitrila. Vazão: 1,4 mL/min.	280 nm	Membrana nanofibrosa	Chen et al., 2012

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
Microbiológico	Microrganismo: *S. aureus* (ATCC65389). 8 µL da solução tampão amostra de cada dia foi pipetada em discos de 6 mm. Os discos foram colocados em placas contendo ágar nutriente.	Halos de inibição	Membrana nanofibrosa	Chen et al., 2012
CLAE	Coluna: Restek RP-C18 (250 x 4,6 mm; 5µm). FM: PBS 0,05 M: acetonitrila: metanol (84:8:8). Vazão: 1,5 mL/min.	215 nm	Revestimento de hidrogel	Cometa et al., 2012
Microbiológico	Microrganismo: MRSA ATCC 33591 ($2,9 \times 10^8$ UFC/mL). Discos de antibióticos foram encubados em suspensão bacteriana que foi diluída em 1:10 e espalhadas em placas de ágar.	Halos de inibição	Revestimento de hidrogel	Cometa et al., 2012
CLAE	Coluna: Supelcosil^{TM} LC-18 (250 x 4,6 mm × 5 µm). FM: solução tamponante acetato 0,075 M (pH 5,0): acetonitrila (92:8 v/v). Vazão: 0,8 mL/min.	230 nm	Plasma humano	Gomez et al., 2012
CLAE	Coluna: Spherisorb C18 ODS (150 x 4,6 mm; 5 µm) acoplada e coluna de guarda µBondapak C18 10 µm. Para plasma humano, FM: solução tamponante fosfato de amônio 0,05M com 11% acetonitrila. Para a salina, FM consistiu na fase móvel utilizada para plasma adicionada de hidróxido de sódio 1 M (0,2 mL/100 mL fase móvel).	Plasma: 240 nm Salina: 198 nm	Plasma humano e salina, soro e lavado broncoalveolar de ratos	Hagihara et al., 2012

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C8 (125 × 4,0 mm; 5 µm). FM: metanol: fosfato de sodio hidrogenado 0,1 M (40/60, v/v). Vazão: 1 mL/min.	280 nm	Plasma humano	Hu et al., 2012
Microbiológico	Uma suspensão de *S. aureus* NCTC 6571 (1,5 x 10^8 UFC/mL) foi passada na superfície das placas de ágar. 5 poços foram cortados no ágar e cada poço inoculado com 100 µL de solução PBS contendo uma de cada concentração: 1 µg; 10 µg e 100 µg ou do sobrenadante coletado do depósito de fibrina encapsulado.	Halos de inibição	Depósito de fibrina	Hyatt et al., 2012
CLUE – EM	Phenomenex Kinetex C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) a 40°C. A eluição gradiente foi: A: 95:5 (v/v) água: acetato de amônio 0,2 M, pH 9, e B: 65:30:5 (v/v/v) água: metanol: acetato de amônio 0,2 M, pH 9. 50 % B em 0 min a 70 % B em 20 min e de 70 % B a 100 % B em 0,1 min e então voltar a 100 % B por 10 min, a vazão foi de 200 µL/min.	280 nm *m/z* 724,71	Pó liofilizado para solução injetável	Hadwiger et al., 2012

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
Microbiológico	Meio antibiótico número 8 (100 mL) foi semeado com 4 mL de uma suspensão de esporos *Bacillus subtilis* ATCC 6633, e adicionada em placas de petri. 1 mg/mL de soluções estoque de vancomicina HCl ou produtos de vancomicina foram preparadas com concentração final de 10 g/mL (produtos) e curvas foram preparadas em solução tamponante fosfato pH 4,5. A concentração média de vancomicina (10 µg/mL; 50 µL) foi adicionada a 3 de 6 cilindros em cada placa em posições alternantes e os cilindros remanescentes receberam vancomicina amostra (10 µg/mL).	Halos de inibição	Pó liofilizado para solução injetável	Hadwiger et al., 2012
CLAE	Coluna: Mediterranea^{TM} Sea18 (150 × 4,6 mm; 5 µm). FM: solução tamponante fosfato de potássio 20 mM (pH 6,9): acetonitrila (88:12, v/v). Vazão: 1,0 mL/min.	200 nm	Mesoporos de sílica	Molina-Maso et al., 2012
Microbiológico	Microrganismo: *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Placas com meio antibiótico nº 2 foram preparadas e inoculadas. Discos foram preenchido com alíquotas de 20 µL.	Halos de inibição	Mesoporos de sílica	Molina-Maso et al., 2012
CLAE	Coluna: Nucleosil RP-18 (150 x 4,6 mm; 5 µm). FM: acetonitrila: solução tamponante fosfato de sódio dehidrogenado 50 mM (pH 2,5) (10:90, v/v). Vazão: 1 mL/min.	230 nm	Solução bicarbonato de Krebs-Ringer	Shiraish et al., 2012

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: RP-18 (100 x 4,6 mm; 5 µm). FM: água: acetonitrila: formato de amônio 100 mM (78:12:10).	*a*	Cimento ósseo	Ueng et al., 2012
Microbiológico	Microrganismo: MSSA ATCC 25923 e MRSA ATCC 43300. Discos contendo 35 µL da amostra teste e concentração padrão de vancomicina. Os discos foram colocados em ágar semeado com MSSA- ou MRSA e encubado *overnight* a 37°C.	Halos de inibição	Cimento ósseo	Ueng et al., 2012
CLAE	Coluna: RP18 (100 x 4,6 mm; 5 µm). FM: água: acetonitrila: formato de amônio 100 mM (78/12/10, v/v).	*a*	Cimento ósseo	Chang et al., 2011
Microbiológico	Microorganismo: MSSA cepa ATCC 25923, e MRSA cepa ATCC 43300, e um isolado VISA do laboratório. As amostras foram inoculadas com as bactérias teste 10^5 UFC/ml em placas de 96 poços com meio de cultura a 37°C por 24 h.	Halos	Cimento ósseo	Chang et al., 2011
CLAE	Coluna: Gemini® II C18 (250 x 4,6mm; 5 µm). FM: A solução tamponante: acetonitrila: metanol (91:5:4) e B solução tamponante: acetonitrila: metanol (84:8:8). A eluicao gradiente foi: 100 % A por 2 minutos, para 100 % B em 12 minutos, mantém por 16 minutos, e retorna e 100 % A por 5 minutos. Vazão: 1,2 mL/min..	210 e 280 nm	Tendão	Grayson et al., 2011

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: Pursuit RP C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm). FM: trimetilamina: ácido fosfórico : tetrahidrofurano: acetonitrila.	280 nm	Válvula cardíaca	Jashari et al., 2011
CLAE	Coluna: C8 Symmetry. FM: ácido heptassulfônico 0,01 M: acetonitrila (85:15, v/v). Vazão: 1,4 mL/min.	280 nm	Cápsula Poly(lactide-*co*-glycolídeo)	Ueng et al., 2011
Microbiológico	Microrganismo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 259523). As amostras foram diluídas ou concentradas a 50 mg/mL. Soluções (8 mL) de cada amostra de solução tamponante foram tomadas diariamente e pipetadas em discos de 7 mm, que foram colocados em placas com ágar nutriente.	Halos de inibição	Cápsula Poli(lactideo-*co*-glicolídeo)	Ueng et al., 2011
CLAE	Coluna: RP- Hypersil GOLD C18e (50 × 2,1 mm, 1,7 µm). FM: A: água com ácido fórmico 0,1% e B: acetonitrila. A eluição gradiente foi: 0 min. (99:1, v/v; vazão de 0,7 mL/min); 2 min (70:30, v/v; vazão de 1,5 mL/min); 5 min (60:40, v/v. Vazão: 1,3 mL/min).	215 nm	Plasma e urina humanos	Baranowska et al., 2010
CLAE	Coluna: µBondapack C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel e outras condições estão descrito na monografia correspondente a este fármaco, presente na farmacopeia europeia.	280 nm	Mini tabletes oculares	Bozdag et al., 2010

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
Microbiológico	Microrganismo: *Bacillus subtilis* ATTC 6633. Água estéril foi adicionada em três mini tabletes e as amostras foram colocadas em banho ultrassônico por 3 horas. Soluções estoque foram diluidas em solução tamponante fosfato 0,1 M, pH 8, para obter concentrações de 2 e 10 µg/mL. Meio antibiótico nº 11 foi semeado com uma suspensão de 10^6 UFC/mL.	Potência	Mini tabletes gama-irradiados	Bozdag et al., 2010
LC – UV/EM	Coluna: Zorbax extended C18 (250 x 3,0 mm, 5 µm) FM: metanol: água: acetato de amônio 0,2 M (pH 9,0) (30:65:5; v,v,v). Vazão: 150 mL/min.	*a*	Pó liofilizado para solucao injetavel e mistura bioadesiva	Bozdag et al., 2010
CLAE	Coluna: Lichrospher 100 RP 18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). FM: tetrahidrofurano: acetonitrila: água contendo 0,4 % trimetilamina (pH 3,2 com ácido fosfórico) (1:7:92; v/v/v). Vazão: 1,2 mL/min.	280 nm	Pó liofilizado para solucao injetavel e mistura bioadesiva	Bozdag et al., 2010
CLAE	Fase móvel solução tamponante fosfato de potássio 0,05 M: acetonitrila (91:9, v/v) e vazão de 2 mL/min.	235 nm	Solução oftálmica	Chédru-Legros et al., 2010

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
Microbiológico	Microrganismo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Após lavar, a membrana foi preenchida com TSB contendo inóculo com 10–100 UFC/mL. Soluções de antibiótico foram colocadas no meio que foi congelado por diferentes períodos.	Turbidez	Membrana de filtração	Chédru-Legros et al., 2010
CLAE	Coluna: Symmetry RP18 (100 x 3 mm) com coluna de guarda Symmetry RP18 (20 x 3,9 mm). A fase móvel consistiu em metanol: acetato de amônio 0.01 M (pH 3,0) (26:74, v/v) e vazão de 1,0 mL/min.	247 nm	Solução de vancomicina em Ora-sweet® e água	Ensom et al., 2010
CLAE	Coluna: Synergi Hydro-RP (250 x 4,6 mm; 4 µm). A fase móvel consistiu em A: fosfato de amônio e B: metanol. A eluição gradiente foi: 0-12 min (90-40:10:60, v/v); 12-1.5 min (40-0:60-100, v/v); 12.5-13.5 min (0:100, v/v); 13.5-14 min (0-90: 100:10); 14-15 min (90:10, v/v) e vazão de 1,0 mL/min.	230 nm	Gel de agarose	Hoang ti et al., 2010
Espectrofotometria UV	Implantes carregados com o fármaco foram colocados em vials de 30 mL preenchidos com solução tamponante fosfato pH 7,4, agitado por shaker orbital 100 rpm e 37 °C. em tempos pré-determinados, o diluente era reposto com solução tamponante fosfato fresco.	238 nm	Implante ósseo	Hoang ti et al., 2010

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: Phenomenex RP C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm) e coluna de guarda (LC18). FM: acetonitrila: solução tamponante fosfato de sódio dehidrogenado (50 mM), pH 4,0 (10:90). Vazão: 1,0 mL/min.	198 nm	Matriz ósseo descalcificada	Saraf et al., 2010
Microbiológico	Microorganismo: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, 10^6/mL. Meio: 5 g Bacto Peptone, 3 g Lab-Lemco Powder e 15 g Bacto Agar em 1000 mL água. Vancomicina foi dissolvida em água a 100 mL. A solução foi diluída com cloreto de sódio isotônico para preparar as concentrações referência (2, 4, 8, 16, e 32 µg/mL).	Halos de inibição	Cimento de fosfato de cálcio polmetilmetacrilato	Urabe et al., 2010
CLAE	Coluna: CAPCELL-PAK C18 UG120 (250 x 4,6 mm; 5 µm). FM: A: solução tamponante trimetilamina (pH 3,2): acetonitrila: tetrahidrofurano (92:7:1, v/v); e B: solução tamponante trimetilamina (pH 3,2): acetonitrila: tetrahidrofurano (70:29:1; v/v) A eluição gradiente foi: A (10 min) gradiente linear (25 min); B (5 min). Vazão: 1 mL/min.	280 nm	Cimento de fosfato de cálcio polmetilmetacrilato	Urabe et al., 2010

Tabela 1. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: Purospher® STAR RP-18 encapada (250 x 4 mm; 5 µm) com coluna de guarda LiChrospher® 100 RP-18 encapada (4,4 mm; 5 µm). FM: acetonitrila: metanol: 0,05 % ácido trifluoroacético em água. A eluição gradiente foi: 0 min. (3:1:96, v/v, vazão de 1,0 mL/min); 30 min (29:1:70 v/v, vazão de 1,2 mL/min); 60 min (49:1:50 v/v, vazão de 1,4 mL/min.).	210 nm	Urina humana	Baranowska et al., 2009
Microbiológico	Microrganismo: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p. Meio antibiótico nº 8 foi inoculado através da adição de 2 mL de suspensão de *S. aureus* em 100 mL do meio. O inóculo foi de 2 × 10^6 CFU/mL.	Halos de inibição	Pó liofilizado para solução injetável	Zuluaga et al., 2009

Tabela 2. Métodos analíticos para quantificação de vancomicina em Compêndios Oficiais

Método	Condições	Sistema de detecção	Matriz	Referência
Microbiológico	Técnica de cilindro: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; Meio 32; condições de incubação: 32-35ºC por 5 dais. Condição sugerida de inóculo: meio 8. Solução estoque: solvente inicial: água; concentração final: 1 mg/mL; usar dentro de 7 dias. Solução teste: diluente final: solução tamponante (ácido bórico e cloreto de potássio), concentração média: 10 µg/mL	Halos de inibição	Pó liofilizado para solução injetável	Farmacopeia Britânica, 2012
CLAE	Coluna: (250 x 4,6 mm; 5 µm) C18. FM: A: a 4 mL de trimetilamina adicionar 1996 mL de água e ajustar para pH 3,2 com ácido fosfórico; a 920 mL desta solução adicionar 10 mL de tetrahidrofurano e 70 mL de acetonitrila, e B: a 4 mL de trimetilamina adicionar 1996 mL de áua, ajustar para pH 3,2 com ácido fosfórico; a 700 mL desta solução adicionar 10 mL de tetrahidrofurano e 290 mL de acetonitrila. O gradient foi: 0-13 min: 100 % A; 13-22 min: 100-0 % A e 0-100 % B e vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção 20 µL	280 nm	Pó liofilizado para solução injetável	Farmacopeia Britânica, 2012

Tabela 2. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
Microbiológico	Soluções amostra: Pesar precisamente uma quantidade de amostra equivalente à 25 mg (potência) de vancomicina, de acordo com a quantidade estipulada, e dissolver em água para obter 25 mL. Tomar alíquota adequada desta solução e adicionar solução tamponante fosfato 0,1 M, pH 4,5, para obter soluções de 100 mg/mL e 25 mg/mL	Halos de inibição	Pó liofilizado para solução injetável	Farmacopeia Japonesa, 2011
Espectrofotometria	Dissolver uma quantidade de vancomicina amostra equivalente à 5 mg de vancomicina em 50 mL de água e determinar o espectro de absorção	279 e 283 nm	Pó liofilizado para solução injetável	Farmacopeia Japonesa, 2011
Microbiológico	Técnica de cilindro: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; Meio 32; condições de incubação: 32-35ºC por 5 dais. Condição sugerida de inóculo: meio 8; Solução estoque: solvente inicial: água; concentração final: 1 mg/mL; usar dentro de 7 dias. Solução teste: diluente final: solução tamponante (ácido bórico e cloreto de potássio 0,2 M), concentração média: 10 µg/mL	Halos de inibição	Pó liofilizado para solução injetável	USP, 2016

Tabela 2. (continuação) Métodos analíticos para quantificação de vancomicina

Método	**Condições**	**Sistema de detecção**	**Matriz**	**Referência**
CLAE	Coluna: 250 x 4.6 mm; 5um; empacotada L1. FM: A: trietilamina e água (1:500). Ajustar ácido fosfórico para pH 3,2; B: acetonitrila, tetrahidrofurano, e solução A (7:1:92) e solução C: acetonitrila, tetrahidrofurano, e solução A (29:1:70). O gradiente foi: 0-12 min 100 % A; 12-20 min 100 % A; 20-22min 0 % A; 22-23 min 100 % A; 23-30 min 100% A e vazão de 2,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL	280 nm	Pó liofilizado para solução injetável	USP, 2016

4. ASPECTOS GERAIS DO FÁRMACO

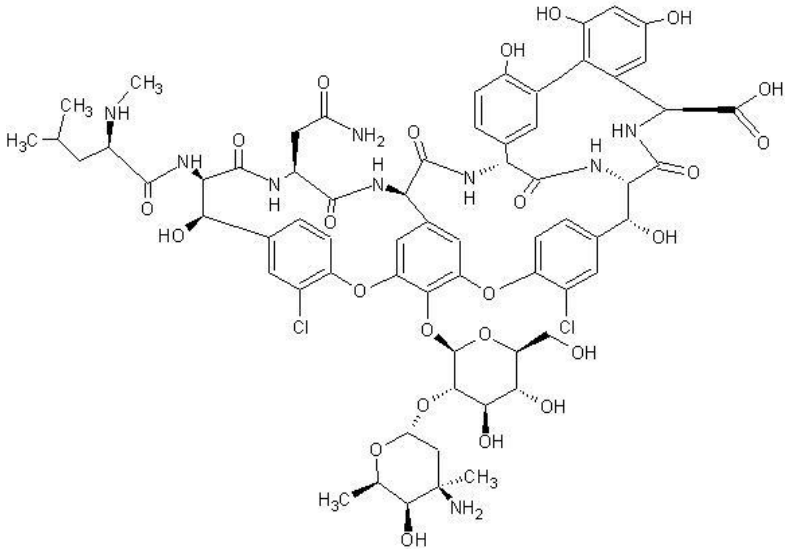

Figura 5. Estrutura da vancomicina

Nome genérico: vancomicina

Nome químico: (1 – S, 2 – R, 18 – R, 19 – R, 22 – S, 25 – R, 28 – R, 40 – S) – 48 [(2 – S, 3 – R, 4 – S, 5 – S, 6 – R) – 3 – [(2 – S, 4 – S, 5 – S, 6 – S) – 4 – amino – 5 – hidroxi – 4,6 – dimetiloxan – 2 – il]oxi – 4,5 – dihidroxi – 6 – (hidroximetil)oxan – 2 – il]oxi – 22 – (2 – amino – 2 – oxoetil) – 5,15 – dicloro – 2,18,32,35,37 – pentahidroxi – 19 – [[(2 – R) – 4 – metil – 2 – (metilamino) pentanoil]amino] – 20,23,26,42,44 – pentaoxo – 7,13 – dioxa – 21,24,27,41,43 pentazaoctaciclo[26.14.2.2^(3,6).2^(14,17).1^(8,12).1^(29,33).0^(10,25).0^(34,39)]pentacont a – 3,5,8,10,12(48),14,16,29(45),30,32,34(39),35,37,46,49 – pentadecaeno – 40 – ácido carboxílico.

Fórmula química: $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$

Massa molar: 1449,27 g/mol

Propriedades físico-químicas: Apresenta-se na forma de pó cristalino branco ou quase branco, higroscópico, facilmente solúvel em água e ligeiramente solúvel em etanol (JP, 2011; BP, 2012; EP, 2016), insolúvel em éter e acetona (MERCK, 2001).

Categoria: Antibiótico

Classe: Glicopeptídeo de primeira geração

pH: 2,5 a 4,5

pKa: Os valores de pKa reportados para vancomicina são 7,75; 8,89; 9,59; 10,4 e 12,0 para alcalino e 2,18 para ácido (TAKÁCS-NOVÁK, 1993).

Comercialização de vancomicina no Brasil: No Brasil a vancomicina é comercializada sob a forma de cloridrato de vancomicina, em que cada ampola contém 500 mg ou 1 g do fármaco: Vancocina CP® (medicamento referência) pelo laboratório Antibióticos do Brasil; cloridrato de vancomicina (medicamento genérico) pelos laboratórios Eurofarma Laboratórios S.A., Laboratório Teuto Brasileiro S/A, Antibióticos do Brasil Ltda e Blau Farmacêutica S.A., e como medicamento similar, pelos laboratórios União Química Farmacêutica Nacional S/A (Vancotrat®), Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda (Vancoson®), Halex Istar Indústria Farmacêutica Ltda (Hicovan®), Novafarma Indústria Farmacêutica Ltda (Novamicin®) e Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda (Celovan®) (ANVISA, 2017).

Comercialização de vancomicina nosdemais países: *África do sul:*Vancocin; *Alemanha:* Vanco-retiopharm; Vanco-saar; Vanco; *Argentina:* Icoplax; Rivervan; Vancomax; Vancotenk; Varedet; *Austrália:* Vancocin; *Áustria:* Vancocin; Vanycin; *Bélgica:* Vamysin; Vancocin; *Canadá:* Val-Vanco; Vancocin; *Chile:* Kovan; *China:* Laikexin; Vancocin; Vanconal; Vancorin; *Dinamarca:* Bactocin; Vancocin;*Emirados Árabes Unidos:* Vancolon;*Estados Unidos da América:* Lyphocin; Vancocin; *Filipinas:* Kavocil; Vancin; Vancocin; Vancomet; Vanosyn; Vidantin; *Finlândia:* Vancosan; *Grécia:* Rulvon; Vamistol; Vancosan; Voncon; Vondem; Voxin;*Holanda:* Norimko; Vancocin;*Hong Kong:* Lyphocin; *Hungria:* Vancocin; *Índia:* Covancin; Cytovan. Forstaf; Vancocin; Vancogram; Vanlid; *Indonésia:* Vancep; Vantocil; *Irlanda:* Vancocin; *Israel:* Vanco-Teva; Vancoavenir; *Itália:* Copovan; Farmaciclin; Levovanox: Maxivanil; Vancocina; Vancotex; Zengac; *Malásia:* Dhacocin; Tancofeto; Vancotex; *México:* Citerin; Estavam; Vacsol; Vanaurus; Vancocin; Vancox; *Polonia:* Acviscin; Edicin; Vancotex; *Reino Unido:* Vancocin; Edicin; Tancofeto; Vancogen; *República Tcheca:* Edicin; Vancocin; Vanmicira; *Rússia:* Edicin; Vancocin; Vancomabol; Vancorus; *Singapura:* Dhacocin; *Suécia:* Vancocin; *Suíça:* Vancocin; *Tailândia:* Edicin; Vancin-S; Vancogen; *Turquia:* Anko-L; Edicin; Vancocin; Vancorin; Vancotek; *Venezuela:* Vagran; Vanlid (SWEETMAN, 2017).

Diluentes da forma farmacêutica: vancomicina pó liofilizado para injeção deve ser reconstituído em água para injetáveis e depois diluída em solução de cloreto de sódio 0,9 %, glicose 5 % ou de Ringer Lactato para infusão intravenosa em sistema aberto e fechado (VANCOCINA CP, 2014).

4.1. Substância química de referência

Neste trabalho foi utilizado o padrão secundário de vancomicina como substância de referência (SQR), com teor declarado de 96,3 % (validade 04/2020), doado pelo laboratório ABL Antibióticos do Brasil LTDA.

4.2. Forma farmacêutica

A forma farmacêutica utilizada foi o pó liofilizado para injeção de cloridrato de vancomicina com conteúdo declarado de 500 mg da substância ativa (vancomicina), apresentando validade 09/2019. Os produtos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho (forma farmacêutica e substância química de referência) foram doados pelo laboratório ABL Antibióticos do Brasil LTDA (Cosmópolis, SP).

5. ANÁLISE QUALITATIVA

5.1. Características físicas

Vancomicina referência foi analisada quanto à aparência física considerando aspecto, odor e cor (JP, 2011).

5.1.1. Material

Vancomicina substância química de referência descrita no item 4.1 foi utilizada para a análise qualitativa quanto as características físicas.

5.1.2. Método

A análise de vancomicina referência foi realizada visualmente considerando suas características físicas quanto a aspecto, odor e cor.

5.1.3. Resultado e discussão

A análise revelou que a vancomicina se apresenta na forma de pó quase branco e inodoro. Após sua reconstituição em água purificada, a solução obtida é límpida, inodora e incolor. Desta forma, o produto analisado encontra-se de acordo com o estabelecido nas especificações de compêndios oficiais (JP, 2011; BP, 2012; EP, 2016) e é indicativo da identidade deste fármaco.

5.2. Determinação de peso médio

5.2.1. Material

A determinação do peso médio foi realizada para vancomicina na forma de pó liofilizado para solução injetável em balança analítica modelo H51 (Mettler Toledo, Suíça).

5.2.2. Método

O método empregado, descrito na Farmacopeia Brasileira (2019), consiste na pesagem de 20 unidades de frascos ampola do fármaco acima mencionado. Após a pesagem de cada unidade individualmente, foi removido o lacre metálico, a tampa e o rótulo de cada frasco, e seu conteúdo foi retirado e armazenado em outro recipiente. Todos os frascos foram lavados com água e seguido de etanol. Os recipientes foram secos em estufa a 105 ºC por uma hora. Após este tempo, todos foram retirados e mantidos em dessecador até chegar à temperatura ambiente e, então, pesados novamente juntamente com o lacre, tampa e rótulo.

5.2.3. Resultado e discussão

A determinação do peso médio é um importante teste a ser realizado para identificar a uniformidade, homogeneidade e ainda a variação do teor de substância ativa (ZAID et al., 2013). Os resultados devem ser avaliados não aceitando mais que duas unidades fora dos limites de variação estabelecidos. Para a forma farmacêutica utilizada neste trabalho é recomendado, pela Farmacopeia Brasileira (2019), um limite de variação de ± 10%.

O valor do peso médio foi obtido a partir da diferença entre a pesagem inicial e final de cada unidade de frasco ampola. Foi calculadaa média das vinte unidades e o desvio padrão relativo (DPR). Os resultados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Peso médio da vancomicina pó liofilizado para solução injetável

Unidades	Recipiente cheio (g)	Recipiente vazio (g)	Diferença (g)	Peso médio (g)	DPR (%)
1	23,4443	22,9437	0,5006		
2	23,5389	23,0494	0,4895		
3	23,5707	23,0636	0,5071		
4	23,2807	22,7853	0,4954		
5	23,4280	22,8748	0,5532		
6	23,5497	23,0883	0,4614		
7	23,4926	23,0017	0,4909		
8	23,6662	23,1589	0,5073		
9	23,2338	22,7314	0,5024		
10	23,3448	22,8383	0,5065		
11	23,5434	23,0761	0,4673	0,5048	4,06
12	23,6193	23,1131	0,5062		
13	23,4524	22,9459	0,5065		
14	23,5790	23,0758	0,5032		
15	23,4430	22,9009	0,5421		
16	23,3958	22,8874	0,5084		
17	23,2831	22,7718	0,5113		
18	23,5967	23,0915	0,5052		
19	23,3355	22,8122	0,5233		
20	23,2553	22,7466	0,5087		

O gráfico para verificar a distribuição dos pesos obtidos para cada unidade do fármaco estudado em relação aos limites superior e inferior, foi elaborado de acordo com a variação permitida pela Farmacopeia Brasileira (2019), e está representado na Figura 6.

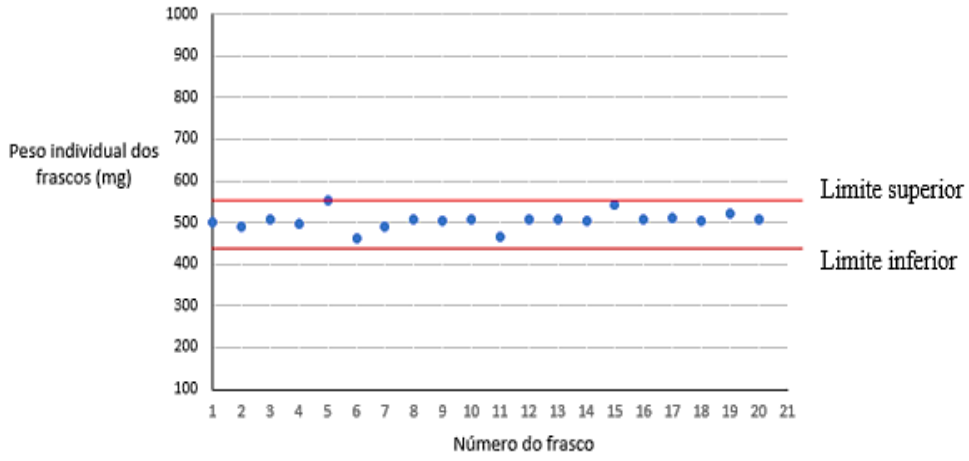

Figura 6. Variação do peso das vinte unidades de frasco ampola de vancomicina pó liofilizado para solução injetável.

Conforme mencionado acima, de acordo com o especificado pela Farmacopeia Brasileira (2019), há um limite de variação aceitável de ± 10%, assim, considerando que o peso médio dos vinte frascos ampola foi de 0,5048 g, os limites inferior e superior são, respectivamente, 0,4543 g e 0,5553 g. Observando-se todos os valores obtidos, pode-se concluir que nenhuma unidade ultrapassou os limites impostos e o DPR de 4,06 % foi considerado adequado e, portanto, a forma farmacêutica pó liofilizado encontra-se de acordo com as especificações.

5.3. Determinação da faixa de fusão

5.3.1. Material

O ponto de fusão foi determinado para vancomicina SQR em equipamento Stuart Scientific SMP3 (Staffordshire, UK) usando tubos capilares de vidro de 6,0 cm de comprimento e 1,0 mm de espessura.

5.3.2. Método

A técnica foi realizada através do preenchimento do capilar de vidro com vancomicina SQR, sendo que o mesmo deve ser adicionado aos poucos e com compactação uniforme, desta forma pode-se garantir que ocorrerá a determinação correta dafaixa de fusão do material por igual (FB, 2019).

Após o preenchimento dos capilares estes foram colocados dentro da cela de aquecimento e a decomposição foi verificada através de uma lupa e monitoramento da temperatura.

5.3.3. Resultado e discussão

A vancomicina apresenta lenta decomposição, por isso não fundiu, mas observou-se que houve início da decomposição em 175 ºC devido à mudança de coloração de quase branco para marrom. O ensaio foi realizado até temperatura de 250 ºC, observando-se que não houve fusão do material, apenas escurecimento do conteúdo até marrom escuro. A decomposição de vancomicina referência pode ser vista na Figura 7.

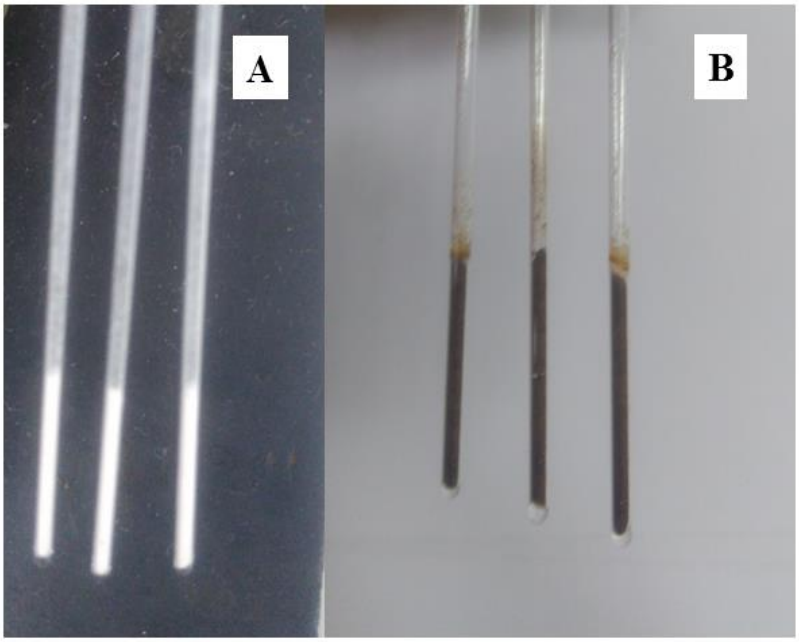

Figura 7. Determinação da faixa de fusão de vancomicina substância química de referência. (A) capilar com vancomicina referência antes do ensaio. (B) capilar com vancomicina referência após aquecimento a 250 °C.

A determinação da faixa de fusão é um método muito simples e de fácil execução, que permite a identificação da substância. Para a vancomicina o método mostrou-se adequado, apesar de não haver a fusão, sabe-se que há a suavização dos sólidos amorfos formados por este fármaco quando submetido ao aquecimento e tende a apresentar uma faixa de fusão ampla (ZARIF et al., 2012).

5.4. Cromatografia em camada delgada

5.4.1. Material

Foram analisadas amostras de vancomicina SQR e pó liofilizado para solução injetável, descritos nos itens 4.1 e 4.2.

O sistema eluente empregado consistiu em água, ácido fórmico e etanol Synth® (Diadema, São Paulo, Brasil) grau analítico. Além de ácido acético e acetato de etila em diferentes proporções durante o desenvolvimento do método e as amostras foram preparadas em água purificada. As soluções foram aplicadas sobre a sílica-gel utilizando seringa de vidro Hamilton®(Nevada, EUA).

O suporte cromatográfico consistiu em placas de sílica-gel 60 F_{254} (20 x 20 cm) com espessura de 0,25 cm (Merck).

A revelação do resultado foi realizada utilizando lâmpadas ultravioleta (UV 254 nm). Posteriormente, o cálculo do fator de retenção (Rf) do método foi realizado.

5.4.2. Método

Para a determinação do sistema eluente foram levantadas informações presentes na literatura (TOMAS, NEWLAND 1987; FOOKS, MCGILVERAY, STRICKLAND, 1968; WAYLAND, WEISS, 1968) e, a partir destas informações, buscou-se a obtenção de um método mais ecológico que os já existentes. As condições testadas encontram-se na Tabela 4:

Tabela 4. Sistemas eluentes testados em CCD para vancomicina

Sistema eluente	Proporção (v:v)	Alíquota (µL)	Concentração da alíquota (µg/mL)
Água: Etanol	60:40	10	250[a]
Água: Etanol	30:70	10	250[a]
Água: Etanol	40:60	10	250[a]
Água: Etanol	50:50	10	250[a]
Água: Etanol: Acetato de etila	50:30:20	10	250[a]
Água: Etanol: Acetato de etila	50:20:30	20	250[a]
Água: Etanol: Acetato de etila	40:20:40	20	250[a]
Água: Etanol: Acetato de etila	60:20:30	20	250[a]
Água: Etanol: Acetato de etila	40:40:20	20	250[a]
Água : Etanol + 1 % ácido acético	30:70	20	250[a]
Água : Etanol + 1 % ácido acético	40:60	20	250[a]
Água : Etanol + 1 % ácido acético	50:50	20	250[a]
Água : Etanol + 1 % ácido acético	60:40	20	250[a]
Água : Etanol + 1 % ácido acético	70:30	20	250[a]
Água: Etanol + 1 % ácido acético	80:20	20	250[a]
Água : Etanol + 2 % ácido acético	60:40	20	250[a]
Água : Etanol + 2 % ácido acético	70:30	20	250[a]
Água: Etanol + 2 % ácido acético	80:20	20	250[a]
Água : Etanol + 3 % ácido acético	60:40	20	500[b]
Água : Etanol + 3 % ácido acético	70:30	20	500[b]
Água : Etanol + 1 % ácido fórmico	80:20	20	500[b]
Água : Etanol + 0,9 % ácido fórmico	80:20	30	500[b]
Água : Etanol + 0,9 % ácido fórmico	90:10	30	500[b]
Água : Etanol + 0,8 % ácido fórmico	90:10	30	500[b]
Água : Etanol + 0,7 % ácido fórmico	90:10	30	500[b]
Água : Etanol + 0,6 % ácido fórmico	90:10	30	500[b]

[a]: Solução de trabalho preparada em água: etanol (50:50); [b]: Solução estoque preparada em água

As soluções de vancomicina SQR e amostra foram preparadas em água purificada na concentração de 500 µg/mL e o sistema eluente escolhido foicomposto por água: etanol, adicionado 0,6% de ácido fórmico (90:10, v/v).

As placas de sílica-gel foram previamente ativadas em estufa a 105 ºC por uma hora, e o sistema eluente foi adicionado à cuba cromatográfica até a sua saturação. As aplicações das soluções foram realizadas com seringa de vidro em alíquotas de 30 µL a 1,5 cm do limite inferior da placa. Após a aplicação, as placas foram colocadas dentro das cubas totalmente saturadas e mantidas até que o líquido alcançasse o ponto delimitado como final da corrida cromatográfica. As placas foram retiradas e, após secagem, foram visualizadas usando lâmpada UV a 254 nm. As manchas formadas foram comparadas em tamanho, cor e aspecto e determinado o fator de retenção (Rf), que é a razão entre a distância percorrida pelo fármaco em relação a distância percorrida pelo eluente.

5.4.3. Resultado e discussão

O sistema eluente foi escolhido com base na resolução da mancha, formato e pelo valor de Rf obtido, assim, dentre os testes realizados observou-se que os sistemas eluentes compostos por água: etanol não apresentaram migração da alíquota administrada à placa de sílica, desta forma, adicionou-se o acetato de etila para verificar se o mesmo poderia influenciar na migração da solução de fármaco. O acetato de etila influenciou muito pouco, não permitindo a migração do fármaco. Assim, o próximo passo foi a adição de ácido acético, o que permitiu a migração, entretanto, com valores de Rf muito baixos, o que tentou ser corrigido alterando-se a concentração do ácido, obtendo-se valores de Rf adequados, mas, o formato das manchas não foram uniformes e apresentavam uma pequena “cauda”. Desta forma, foi realizada a troca do ácido acético pelo ácido fórmico, sendo que este último apresenta maior força de eluição. A substituição do ácido conferiu às manchas formato uniforme sem cauda, assim, o ajuste na concentração do ácido foi realizado de forma a obter o melhor valor de Rf, considerando que o fármaco não permanecesse próximo à origem de aplicação e nem migrasse até o final da placa, para que fosse possível visualizar a separação dos componentes bem como impurezas e produtos de degradação. Assim, determinou-se que o sistema composto por água: etanol com adição de 0,6% de ácido fórmico foi o que apresentou melhor relação entre estes três fatores com valor de Rf = 0,58. A Figura 8 apresenta o resultado quando foram aplicadas as condições acima determinadas.

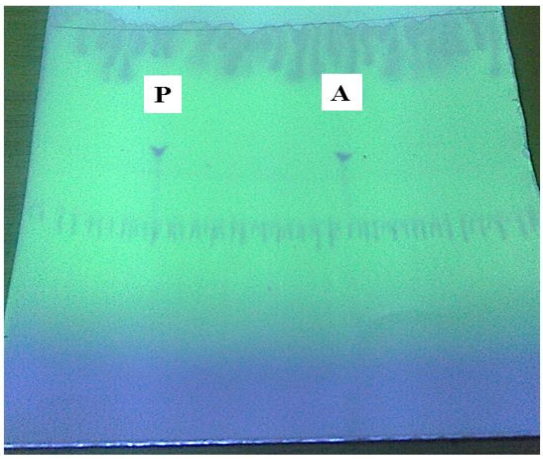

Figura 8. Perfil cromatográfico de vancomicina SQR (P) e vancomicina pó liofilizado para solução injetável (A) com visualização em câmara UV a 254 nm e sistema eluente composto de água + 0,6 % ácido fórmico: etanol (90:10; v,v).

Esta técnica mostra-se eficiente para identificação de substâncias além de ser de fácil execução, de baixo custo e rápida. A revelação das placas foi realizada utilizando vapores de iodo e sob luz UV a 254 nm. Ambos agentes reveladores mostraram-se eficientes, mas, a opção de revelação em luz UV foi a escolhida devido à sua facilidade, rapidez de obtenção dos resultados e, principalmente, por não gerar resíduos, tornando o método mais verde e possibilitando o seu desenvolvimento por qualquer analista, já que os vapores de iodo podem causar reações alérgicas em alguns indivíduos. Após a revelação em luz UV foi possível a visualização das manchas e o cálculo do Rf.

A Figura 8 sugere a identidade entre a vancomicina SQR e pó liofilizado por meio do aparecimento de apenas uma mancha, de mesma coloração e formatos muito semelhantes além de valores de Rf semelhantes (Rf referência: 0,58 e Rf amostra: 0,56).

5.5. Espectrofotometria na região do UV

5.5.1. Material

Foram analisados vancomicina SQR e pó liofilizado descritos nos itens 4.1 e 4.2. As soluções foram preparadas em água, água: etanol (90:10), água: etanol (95:05), solução tamponante borato pH 3,0, solução tamponante fosfato pH 6,8 e pH 8,5.

O equipamento utilizado para as leituras foi o espectrofotômetro Shimadzu® (Kyoto, Japão) UV 1800 e cubeta de quartzo com 1cm de caminho óptico e 700 µL de capacidade. As

massas de vancomicina referência e amostra foram pesadas em balança analítica Discovery, Ohaus® (São Paulo, Brasil) modelo DV215CD e filtradas em papel de filtro.

5.5.2. Método

Foram pesados 0,01009 g (equivalente a 10 mg de vancomicina) de vancomicina pó liofilizado para solução injetável e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Todas as soluções estoque foram submetidas a 5 minutos em banho ultrassônico antes de sua utilização, e seu volume foi completado com os diluentes mencionados acima obtendo-se, assim, uma solução estoque de concentração igual a 200 µg/mL. Para o preparo das soluções subsequentes, quando o diluente foi água e água: etanol, o volume foi completado com água purificada apenas. Antes de realizar as leituras todas as soluções foram filtradas em papel de filtro.

Para cada diluente foram feitas diluições a partir da solução estoque, até obter concentração com valores de absorvância dentro dos limites da Lei de Lambert-Beer. As leituras foram feitas em intervalos de tempo definidos em 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas, para verificar a estabilidade do fármaco nos diferentes diluentes.

Foi feita a varredura na faixa de 200 a 400 nm para determinação do comprimento de onda de máxima absorçãoe escolha do melhor diluente, em que o fármaco permaneceu mais estável (considerando um período de 24 horas do teste de estabilidade) e foi solúvel, a ser utilizado no desenvolvimento e validação do método. A sobreposição dos espectros de vancomicina referência e pó liofilizado foi realizada para identificação do fármaco.

5.5.3. Resultado e discussão

Os espectros de absorção da vancomicina pó liofilizado para cada diluente testado, com exceção da solução tamponante pH 3,0, devido a grande quantidade de ruídos, estão representados na Figura 9.

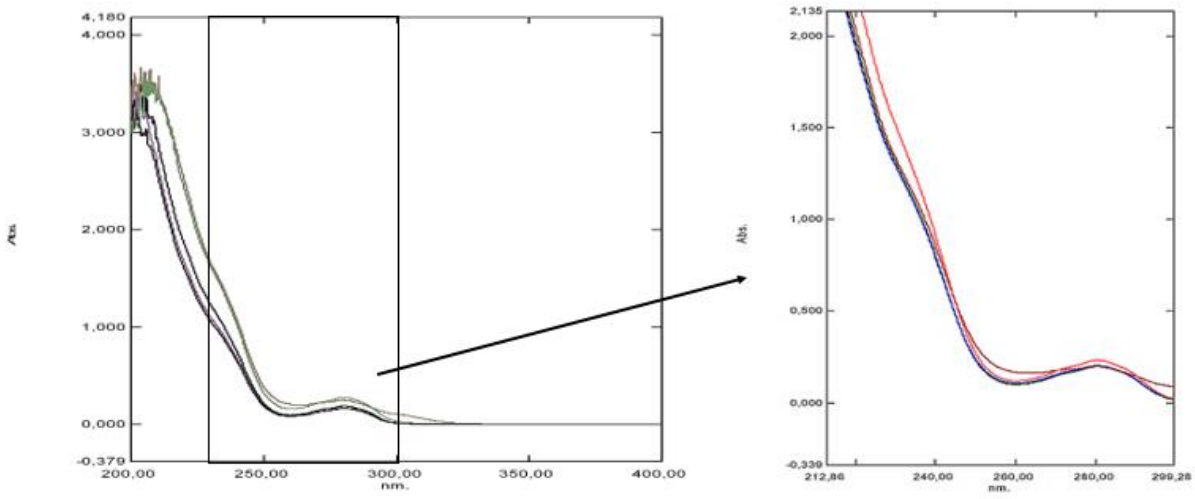

Figura 9. Sobreposição dos espectros de vancomicina pó liofilizado em água (preto), água: etanol (90:10) (vermelho), água: etanol (95:05) (verde), solução tamponante pH 6,8 (azul) e pH 8,5 (vinho) na concentração de 50 µg/mL.

Para determinar o melhor diluente a ser utilizado, a Tabela 5 mostra os valores de concentração de vancomicina pó liofilizado que apresentaram absorvância próximos a 0,2 e máximo comprimento de onda.

Tabela 5. Diluentes testados para o desenvolvimento do método espectrofotométrico na região do UV a 280 nm e as respectivas concentrações utilizadas

Diluente	Concentração (µg/mL)	Absorvância (tempo 0)	Absorvância (tempo 24 h)	Comprimento de onda (nm)
Água	62	0,208	0,217	280
Água: Etanol (90:10)	60	0,223	0,230	280
Água: Etanol (95:05)	62	0,209	0,212	280
Tampão pH 3,0	42	0,220	0,225	280
Tampão pH 6,8	42	0,202	0,206	280
Tampão pH 8,5	40	0,202	0,215	280

A partir dos dados da Tabela 5, constata-se que o fármaco permaneceu estável ao longo das 24 horas de leitura e então determinou-se que os diluentes água e asolução tamponante fosfato de potássio pH 6,8 apresentaram serem melhores que os demais devido ao perfil do espectro e pela concentração de fármaco utilizado, sendo que a solução tamponante pH 6,8 foi

o melhor diluente devido a menor concentração de fármaco utilizado, em comparação à água, evitando assim o desperdício do fármaco e reduzindo, desta forma, a geração de resíduos e custo da análise, e também por estar em uma faixa de pH neutra, possibilitando o emprego deste diluente em outros métodos como, por exemplo, o método microbiológico turbidimétrico, garantindo uma faixa de pH adequada para o crescimento do microrganismo. Foi feita também a sobreposição dos espectros de vancomicina referência e pó liofilizado para solução injetável em solução tamponante fosfato pH 6,8 na concentração de 100 µg/mL para demonstrar a equivalência entre os espectros e mesmo comprimento de onda de máxima absorbância. A Figura 10 mostra esta sobreposição.

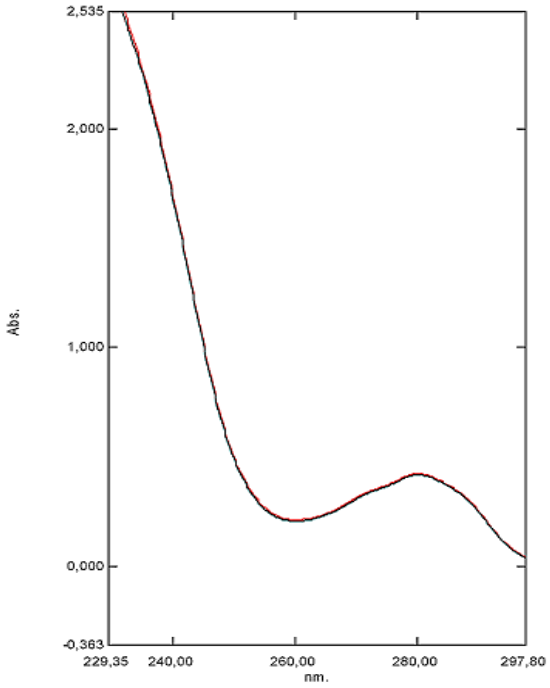

Figura 10. Sobreposição de vancomicina referência (preto) e pó liofilizado para solução injetável (vermelho) em solução tamponante fosfato de potássio pH 6,8, na concentração de 100 µg/mL.

Desta forma, este método mostrou-se adequado para identificação do fármaco, pois o mesmo apresentou perfil muito semelhante nos seis diluentes testados, mesmo comprimento de onda de máxima absorção e a sobreposição dos espectros de vancomicina referência e pó liofilizado ocorreu perfeitamente evidenciando sua identidade. Ainda, mostrou ser uma técnica de rápida e fácil execução, muito simples, com geração de resíduos reduzida devido a quantidade de diluente e fármaco utilizados ser mínima, principalmente devido à realização do método em escala miniaturizada.

5.6. Espectrofotometria na região do infravermelho

5.6.1. Material

As análises foram realizadas para vancomicina SQR e pó liofilizado em equipamento Shimadzu® (Kyoto, Japão) com transformada de Fourier, modelo IR Prestige-21. As pastilhas foram confeccionadas utilizando como reagente o brometo de potássio (KBr) (Neon®), mantido em estufa de secagem e esterilização Fanem® (São Paulo, Brasil) modelo 315 SE, a 105ºC por, no mínimo, 24 horas. Os pós foram pesados em balança analítica Discovery, Ohaus® (São Paulo, Brasil) modelo DV215CD.

5.6.2. Método

Para o preparo das pastilhas uma diluição de 1:10 (p/p) foi realizada de vancomicina referência em KBr, desta forma o erro de pesagem dos pós é reduzido e a análise se torna mais precisa e reprodutível. A partir desta diluição uma massa de 10 mg foi pesada (equivalente a 1 mg de vancomicina), transferida para um almofariz e pistilo de ágata e foi triturado juntamente com 140 mg de KBr, consistindo assim na segunda diluição, e transferidos para uma prensa mecânica (de forma a obter uma pastilha de 150 mg e concentração de 1,0 mg de vancomicina referência) mantendo uma força de compressão de 90 kN por 7 minutos. O mesmo foi realizado para vancomicina pó liofilizado a partir do *pool* de vinte frascos ampola, foi realizada a diluição 1:10 em KBr. O KBr utilizado em todos os processos foi previamente dessecado em estufa a 105ºC por, no mínimo, 24 horas. As análises foram obtidas em transmitância na região espectral do infravermelho médio com absorção entre 4000 a 400 cm^{-1}, com resolução de $2cm^{-1}$, utilizando o software IR Solution®. A análise estatística foi realizada utilizando como software o Microsoft Office Excel.

5.6.3. Resultado e discussão

Como a vancomicina pó liofilizado para solução injetável não possui adjuvantes na sua composição, apenas os espectros da amostra e referência foram realizados e encontram-se sobrepostos na Figura 11.

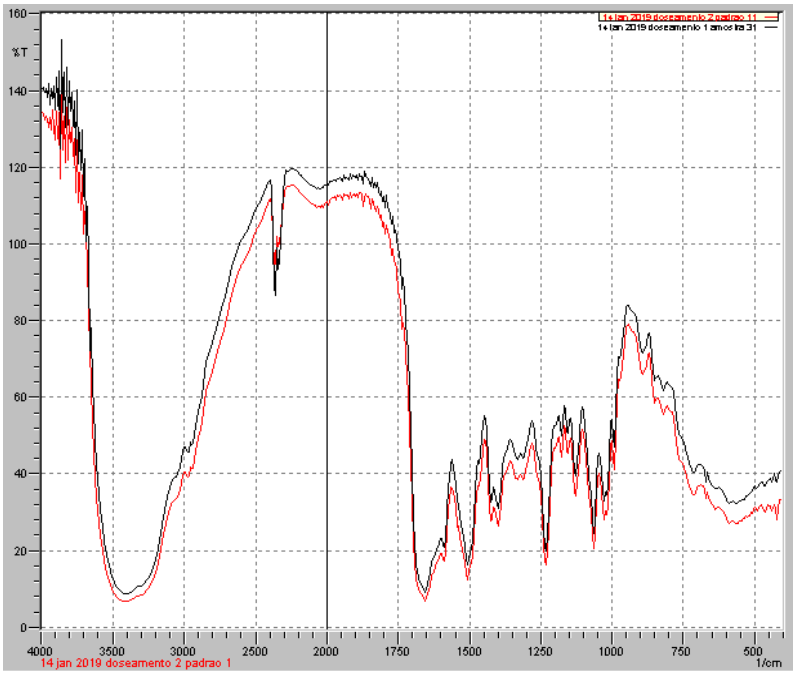

Figura 11. Sobreposição dos espectros de vancomicina SQR (vermelho) e pó liofilizado para solução injetável (preto) na concentração de 1,6 mg/150 mg, obtidos na região do infravermelho em pastilhas de KBr.

Observando-se o espectro da vancomicina pode-se identificar a presença de estiramentos característicos de alguns grupos funcionais que absorvem nesta região. O deslocamento em que estes grupos absorvem encontram-se na Tabela 6 (PAVIA et al., 2012).

Tabela 6. Grupos funcionais da vancomicina que absorvem na região do infravermelho médio

Grupo funcional	Comprimento de onda (1/cm)*	Comprimento de onda observado (1/cm)
O – H álcool	3400-3300	3388
O – H ácidos carboxílicos	3300-2500	3269
C-Cl	1127	1126
C – H sp^3	1450-1375	1425-1398
C = C aromático	1600-1475	1513-1597
C = O amida	1820–1660	1672
C-O-C	1230	1232
Dobramento N-H amina primária	3400	3408
Dobramento N-H amina secundária	1650	1653

*Valor de referência (PAVIA et al, 2012).

5.7. Cromatografia líquida de alta eficiência

5.7.1. Material

As análises foram realizadas para vancomicina referência e pó liofilizado em cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters® composto por bomba cromatográfica gradiente binária Waters® 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detector UV-VIS Waters® 2487. A fase estacionária utilizada consistiu em coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) e fase móvel composta por água, 0,1% ácido acético e etanol foi utilizada para chegar às condições cromatográficas desejadas variando a concentração destes solventes e a vazão. As soluções foram preparadas em solução tamponante fosfato de potássio pH 6,8 e filtradas em membranas de 0,45 µm. Para o preparo das soluções foram utilizados balança analítica Discovery, Ohaus® (São Paulo, Brasil) modelo DV215CD, banho ultrassônico Unique® (São Paulo, Brasil) e micropipetador Research® Plus 100-1000 µL Eppendorf (Hamburg, Alemanha).

5.7.2. Método

Foram pesados 0,01009g de vancomicina pó liofilizado (equivalente à 10 mg de vancomicina) e transferidos para balão volumétrico de 50 mL contendo solução tamponante fosfato de potássio pH 6,8 e submetido a banho ultrassônico por 5 minutos, para completa solubilização do fármaco. Após, o balão volumétrico foi completado com o mesmo diluente obtendo-se uma solução de concentração de 200 µg/mL. A partir desta solução estoque, uma alíquota de 2,5 mL foi tomada e transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com o mesmo diluente da solução estoque, obtendo-se solução de trabalho de concentração de 100 e 50 µg/mL. A solução de trabalho foi filtrada em membrana de 0,45 µm antes das injeções e 20 µL foram injetados no sistema cromatográfico. O mesmo procedimento foi realizado para o preparo da solução de vancomicina SQR, neste caso a quantia pesada foi de 0,01038 g de vancomicina SQR (equivalente a 10 mg de vancomicina).

Uma série de combinações utilizando os solventes água purificada, ácido acético e etanol foram realizadas de forma a obter as condições cromatográficas adequadas para a quantificação de vancomicina. Estes solventes foram escolhidos com base em trabalhos encontrados na literatura (HOANG TI et al., 2010; JP, 2011; ELKHODAIRY et al., 2014), promovendo a substituição dos solventes orgânicos tóxicos por solventes menos tóxicos, como o etanol e o ácido acético, e a substituição de soluções tamponantes por água, visando a redução do tempo de lavagem do sistema e manutenção do equipamento. Foi considerada também a vazão utilizada para dar início às análises. O volume de injeção foi mantido em 20 µL e a mesma coluna cromatográfica utilizada em todas as condições testadas. Para cada condição foram realizadas, no mínimo, dez injeções para confirmar a repetibilidade. As condições de análise testadas encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Condições cromatográficas testadas para desenvolvimento de método por HPLC para vancomicina

Fase Móvel	Proporção (v/v)	Vazão (mL/min)	Concentração de vancomicina (µg/mL)
Água: etanol	60:40	1,0	200, 100 e 50[a]
Água: etanol	60:40	0,9	50 [a]
Água: etanol	60:40	0,8	50 [a]
Água: etanol	60:40	0,7	50 [a]
Água: etanol	60:40	0,6	50 [a]
Água: etanol	60:40	0,5	50 [a]
Água: etanol	70:30	0,5	50 [a]
Água: etanol	75:25	0,5	50 [a]
Água: etanol	80:20	0,5	50 [a]
Água: etanol	85:15	0,5	50 [a]
Água: etanol	90:10	0,5	50 [a]
Água + 0,1% ácido acético: etanol	85:15	0,5	50 [a]

[a]: Solução estoque e de trabalho preparadas em solução tamponante pH 6,8.

Com base nos parâmetros de conformidade do sistema (*System Suitability*), tempo de retenção (t_R), fator de retenção (k), fator de cauda (F) e pratos teóricos (N), realizados para 6 injeções, foi definida a melhor condição cromatográfica, conforme os limites especificados, t_R= 2 x volume não detectado; k entre 1 e 10; F < 2,0 e N > 2000 (SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010). Os valores de *System Suitability* e as condições escolhidas encontram-se nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. *System suitability* para o método proposto

Pico	Área	Tempo de retenção (t_R)	Fator de retenção (k)	Fator de cauda (F)	Número de Pratos (N)
1	1613918	3,290	1,05	1,37	4765,98
2	1621282	3,302	1,05	1,36	4982,34
3	1613237	3,302	1,05	1,38	4985,09
4	1613317	3,304	1,05	1,34	4723,46
5	1601320	3,302	1,05	1,41	4916,35
6	1612512	3,301	1,05	1,34	4649,97
Média	1612598	3,300	1,05	1,37	4837,15
DPR (%)	0,40	0,15	0,00	1,95	2,96

Tabela 9. Condições cromatográficas estabelecidas para vancomicina

Parâmetros	Condições
Coluna cromatográfica	Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm; 5µm)
Fase móvel	Água + 0,1% ácido acético: etanol (85:15, v/v)
Vazão (mL/min)	0,5
Volume de injeção (µL)	20

5.7.3. Resultados e discussão

Os cromatogramas obtidos para vancomicina referência e pó liofilizado foram sobrepostos a fim de confirmar a identidade deste fármaco. A Figura 12 apresenta esta sobreposição.

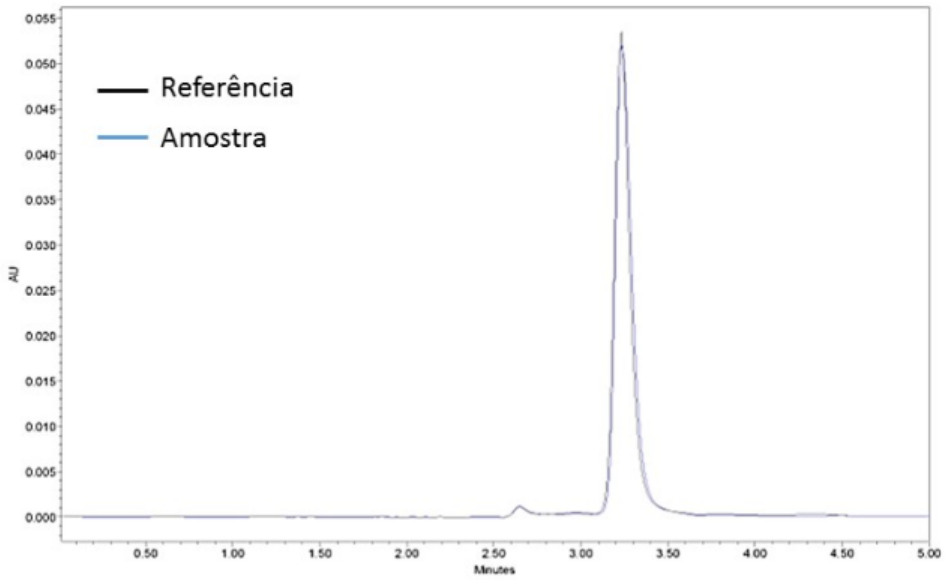

Figura 12. Sobreposição dos cromatrogramas de vancomicina referência (preto) e pó liofilizado (azul) na concentração de 50 µg/mL.

A sobreposição dos cromatogramas possibilitou a confirmação da identidade do fármaco e de sua referência, onde ambos apresentarem mesmo tempo de retenção no mesmo comprimento de onda de máxima absorção (280 nm), e o perfil do pico cromatográfico foi muito semelhante. Desta forma, as condições descritas no item 5.7.1 foram mantidas para a quantificação deste fármaco pelo método cromatográficoa ser descrito no item 6.5.

6. ANÁLISE QUANTITATIVA

6.1. Introdução

O controle de qualidade na indústria farmacêutica, para identificação do teor de substância ativa e o estudo das características físicas e químicas do fármaco, é de fundamental importância para garantir a qualidade do produto final. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos para análise de produtos farmacêuticos é essencial para garantir a eficácia e segurança e o desenvolvimento de um método analítico deve ser seguido do processo de validação para garantir que o método é seguro e adequado para o que é proposto (ICH, 2005).

Segundo a RDC 166 de 2017, a validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos. O processo de validação consiste em analisar e verificar alguns parâmetros de grande importância quesãoseletividade, linearidade, intervalo de trabalho, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez (BRASIL, 2017).

A definição dos parâmetros que deverão ser realizados irá depender da finalidade do método. Segundo a legislação, para a ensaios que visam a quantificação de uma substância específica, os parâmetros linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade e intermediária), seletividade, exatidão e robustez, excluindo-se apenas os limites de detecção e de quantificação, entretanto, como estes dois parâmetros podem ser obtidos de forma muito simples, eles também foram incluídos na validação dos métodos propostos neste trabalho.

6.2. Parâmetros da validação

6.2.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade de o método identificar e quantificar o analito inequivocamente na presença de outras substâncias que possam estar presentes na amostra (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

6.2.2. Linearidade

É a habilidade de o método apresentar resultados que são diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra (ICH, 2005; BRASIL, 2017). Para determinar a linearidade deve-se, no mínimo, ser realizada em cinco concentrações do analito e em triplicata e esta é apenas confirmada quando houver representação gráfica da resposta em função da concentração. A mesma deve ser confirmada pelo gráfico da dispersão dos resíduos acompanhado de análise estatística, a equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo

método dos mínimos quadrados, com coeficiente de correlação superior 0,99 (BRASIL, 2017). Ainda, verificação da homocedasticidade, para aplicação adequada do modelo estatístico e nível de confiança de, no mínimo, 95%.

6.2.3. Faixa de trabalho

É a faixa existente entre a menor e a maior concentração de analito na amostra em que a precisão, exatidão e linearidade estejam confirmadas (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

6.2.4. Limite de detecção (LD)

É a menor quantidade de analito presente em uma amostra que é capaz de ser detectado, mas não necessariamente quantificado sob as condições de análise. A determinação do limite de detecção pode ser realizada por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva analítica (BRASIL, 2017) que foi o escolhido neste trabalho. Para sua obtenção foi utilizada a Equação 1 e, devido à simplicidade de sua obtenção, foi incluído na validação deste método, assim como o limite de quantificação.

$$\mathrm{LD} = \frac{3{,}3\ x\ DP}{IC}$$

Equação 1. Equação para cálculo do limite de detecção.

Em que:

DP: desvio padrão

IC: inclinação da curva analítica.

6.2.5. Limite de quantificação (LQ)

É a menor quantidade de analito presente em uma amostra que é capaz de ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições de análise (BRASIL, 2017). O limite de quantificação foi determinado pela Equação 2.

$$\mathrm{LQ} = \frac{10\ x\ DP}{IC}$$

Equação 2. Equação para cálculo do limite de quantificação.

Em que:

DP: desvio padrão

IC: Inclinação da curva analítica.

6.2.6. Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos de ensaios de amostras homogêneas sob condições estabelecidas (ICH, 2005). Esta deve ser realizada por meio da repetibilidade e precisão intermediaria ou reprodutibilidade. Este parâmetro é determinado pela dispersão dos resultados calculando-se o DPR pela Equação 3.

$$\text{DPR} = \frac{DP}{CMD}\ x\ 100$$

Equação 3. Equação para cálculo da precisão

Em que:

DP: Desvio Padrão

DPR: Desvio Padrão Relativo

CMD: Concentração média determinada

O valor aceitável de DPR deve ser estabelecido de acordo com a metodologia. Neste trabalho foi considerado preciso quando DPR menor que 2,0 % (HORWITZ et al., 1980; AOAC, 2002).

A precisão por repetibilidade ocorre sob as mesmas condições de operação, analista e instrumentação e em um curto intervalo de tempo. Deve ser realizada em nove determinações sendo em três níveis (baixa, média e alta) ou seis determinações à 100 % da concentração do teste.

A precisão intermediária deve expressar variações em um mesmo laboratório, alterando-se analista e em diferentes dias, mantendo as mesmas condições de análise.

A precisão por reprodutibilidade expressa a precisão entre laboratórios. É importante para avaliar a reprodutibilidade do método sob as mesmas condições de análise. Este tipo de precisão normalmente é realizada quando o objetivo é padronizar os métodos analíticos para sua inclusão em compêndios oficiais ou em estudos colaborativos. Neste trabalho apenas a precisão por repetibilidade e intermediária foram realizadas.

6.2.7. Exatidão

É o grau de concordância entre os valores obtidos como resultados em relação a um valor tido como verdadeiro. A exatidão é realizada em, no mínimo, nove determinações em três níveis (80, 100 e 120 %) que contemplem o intervalo linear do método.

Para a validação dos métodos analíticos presentes neste trabalho, a exatidão foi realizada pelo método de adição de padrão, em que, pequenas quantidades conhecidas de vancomicina SQR foram adicionadas à amostra e a porcentagem de recuperação foi calculada a partir da Equação 4.

$$R(\%) = \frac{(Cr - Ca)}{Ct}\ x\ 100$$

Equação 4. Equação para cálculo da exatidão.

Em que:

R: Recuperação percentual

C_r: Concentração adicionada de referência (µg/mL)

Ca: Concentração de amostra (µg/mL)

Ct: Concentração teórica de referência adicionada (µg/mL)

Os limites considerados aceitáveis para exatidão adotados neste trabalho são de 100 ± 2 % (AOAC, 2002).

6.2.8. Robustez

Indica a capacidade de o método resistir a pequenas variações nas condições analíticas (BRASIL, 2017). Estas pequenas variações indicam quais parâmetros são suscetíveis e quais precauções devem ser incluídas no método. O método apresentado por Youden &Steiner (1975) foi aplicado na validação dos métodos desenvolvidos para espectrofotometria na região do ultravioleta e para CLAE. Este método consiste em variações realizadas em sete parâmetros agrupados em oito experimentos, e os efeitos que cada parâmetro exerce irão determinar o quanto estas variações podem alterar a resposta do método, considerando-se que não há interferência quando os efeitos são menores que duas vezes o DPR. Para método desenvolvido para espectrofotometria na região do infravermelho e o turbidimétrico, a robustez foi avaliada por teste F (Snedecore) e test-t (Student).

A análise quantitativa foi realizada através do desenvolvimento e validação de métodos de espectrofotometria na região do UV e infravermelho, CLAE e turbidimétrico.

6.3. Espectrofotometria na região do UV

6.3.1. Material

Vancomicina SQR e pó liofilizado para solução injetável (descritos nos itens 4.1 e 4.2) foram submetidos à análise. Para o preparo das soluções foi utilizadabalança analítica Discovery Ohaus® (São Paulo, Brasil) modelo DV215CD e solução tamponante fosfato de potássio pH 6,8 como diluente. As soluções foram submetidas à banho ultrassônico Ultrassonic Cleaner Unique® (Indaiatuba, Brasil). A cubeta utilizada para a realização das leituras foi de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

6.3.2. Curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi construída a partir da absorvância obtida para 33 concentrações diferentes de vancomicina referência.

Inicialmente foram pesados 0,10384 g de vancomicina referência (equivalente à 100 mg de vancomicina) e transferido para um balão volumétrico de 200 mL. Foi adicionada a solução tamponante fosfato de potássio pH 6,8 e submetido a banho ultrassônico por cinco minutos para completa dissolução do fármaco. O volume do balão volumétrico foi completado com a solução tamponante, obtendo-se uma solução de concentração igual a 500 µg/mL. A partir desta solução estoque, alíquotas foram tomadas e transferidas para balão volumétricode 5 mL para obtenção das 33 concentrações de análise que variaram de 10 a 500 µg/mL de vancomicina. A partir desta curva, seis pontos foram escolhidos para avaliar a linearidade do método.

6.3.3. Método

Os parâmetros de validação para seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez, descritos na RDC 166 (2017) foram seguidos para validar o método desenvolvido, além disso, o doseamento foi realizado para obtenção do teor de vancomicina.

6.3.4. Validação

6.3.4.1.Seletividade

A seletividade foi obtida a partir da comparação entre as absorvâncias obtidas pela vancomicina SQR e amostra. Também foi realizado o estudo de degradação forçada para vancomicina pó liofilizado sob condições de estresse: ácida (HCl 0,01M), básica (NaOH 0,1M), oxidativa (H_2O_2 0,3 %), neutra (água) e fotolítica (luz UV a 254 nm). Foi preparada uma solução

de vancomicina pó liofilizado 200 µg/mL. A partir desta solução estoque foram tomados 12,5 mL e transferidos para um frasco de vidro transparente e adicionados 12,5 mL das soluções degradantes, obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL. Os frascos de degradação ácida, alcalina, oxidativa e neutra foram mantidos em banho de aquecimento a 60ºC, enquanto que a degradação fotolítica foi realizada em câmara com luz UV a temperatura ambiente. Alíquotas foram tomadas nos intervalos de tempo: 0, 2, 4, 6, 8 horas e até 24 horas apenas para a degradação fotolítica. Os espectros obtidos no tempo 0 (logo após o preparo das soluções) e após 8 horas de degradação (para as degradações ácida, alcalina, oxidativa e neutra) e 24 horas (para degradação fotolítica) foram sobrepostos.

6.3.4.2.Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir das curvas obtidas em três dias de análise, através da obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados. O gráfico da dispersão dos resíduos também foi elaborado, para confirmar a linearidade do método, assim como a linearidade e paralelismo por meio da análise de variância (ANOVA). Por meio destas três estatísticas é possível provar a linearidade do método proposto.

Para o preparo da solução foram pesados 0,01038 g de vancomicina SQR (equivalente a 10 mg de vancomicina) e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. O fármaco foi dissolvido na solução tamponante pH 6,8 e submetido ao banho ultrassônico por cinco minutos. O volume foi completado com a mesma solução tamponante, obtendo-se uma solução de concentração teórica de 200 µg/mL. Os pontos escolhidos foram de 50 a 150 µg/mL de vancomicina referência e as leituras foram realizadas em 280 nm utilizando solução tamponante pH 6,8 como branco. Foram construídas três curvas analíticas em três dias diferentes.

6.3.4.3.Limite de detecção (LOD) e quantificação LOQ)

O limite de detecção foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, através do desvio padrão do intercepto (DP) e a inclinação da curva (IC), utilizando a Equação 1. Para o limite de quantificação foi realizado pelo mesmo modo, mas utilizando a Equação 2.

6.3.4.4.Precisão

A precisão foi realizada pelo método de repetibilidade e precisão intermediária. A precisão por repetibilidade (intradia) foi realizada em seis réplicas independentes no mesmo dia, a precisão interdias foi realizada da mesma forma que a intradia, mas em dois dias diferentes na concentração de 90 µg/mL. A precisão intermediária (inter-analista) foi realizada

sob as mesmas condições, variando apenas o analista. O DPR foi calculado para a precisão intradia e inter-analista.

A solução analisada foi preparada com vancomicina pó liofilizado para solução injetável considerando o peso médio obtido (504,82 mg). Foi pesado 0,01009 g de vancomicina pó liofilizado (equivalente a 10 mg de vancomicina) e transferido para balão volumétrico de 100 mL. A solução tamponante pH 6,8 foi adicionada e então mantida em banho ultrassônico por cinco minutos. O balão volumétrico foi completado com o mesmo diluente, obtendo-se assim solução de 100 µg/mL de vancomicina pó liofilizado. A partir desta solução estoque, uma alíquota de 4,5 mL foi tomada e transferida para balão volumétrico de 5 mL, obtendo-se uma solução de concentração igual a 90 µg/mL de vancomicina pó liofilizado, a qual foi utilizada para a determinação da precisão.

6.3.4.5.Exatidão

A exatidão foi obtida pelo cálculo de recuperação. Para isso, foram preparadas soluções de vancomicina referência e pó liofilizado. Foram pesados 0,02524 g de vancomicina pó liofilizado e 0,02596 g de vancomicina SQR (equivalente 25 mg de vancomicina) e cada um transferido para balões volumétricos de 25 mL, obtendo-se duas soluções de 1000 µg/mL cada. A partir destas soluções foram tomadas alíquotas de 500 µL de cada uma e transferidas para dois balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se soluções de vancomicina referência e pó liofilizado na concentração de 50 µg/mL. Para o preparo das demais soluções de recuperação foram mantidas as alíquotas de vancomicina pó liofilizado alterando apenas as de vancomicina referência. As alíquotas de vancomicina referência tomadas para o preparo de R1, R2 e R3 foram, respectivamente, 300 µL, 500 µL e 700 µL. A Tabela 10 apresenta como as soluções foram preparadas e as concentrações empregadas.

Tabela 10. Preparo das soluções para obtenção da exatidão pelo método espectrofotométrico na região do UV para vancomicina

	Vancomicina amostra (µg/mL)	**VancomicinaSQR (µg/mL)**	**Concentração final teórica (µg/mL)[ab]**
Amostra	50	-	50
R1	50	30	80
R2	50	50	100
R3	50	70	120
Referência	-	50	50

[a]: Diluição em balão volumétrico de 10 mL; [b]: Cada nível foi preparado em triplicata

6.3.4.6.Robustez

A robustez foi realizada de acordo com o método de Youden & Steiner (1975). Foram selecionados sete parâmetros do método, sendo eles: comprimento de onda, volume da cubeta, filtração (realização desta etapa ou não), marca do fosfato dibásico de potássio, marca do fosfato monobásico de potássio, tempo de ultrassom e fonte de água purificada, nos quais foram feitas pequenas variações que se encontram na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros alterados para avaliação da robustez do método por Youden & Steiner (1975) para o método espectrofotométrico proposto

	Experimento							
Parâmetro	**1[a]**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
A	280	280	280	280	282	282	282	282
B	0,7	0,7	4,0	4,0	0,7	0,7	4,0	4,0
C	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
D	Sigma	Sigma	Qhemis	Qhemis	Qhemis	Qhemis	Sigma	Sigma
E	Synth	Vetec	Synth	Vetec	Vetec	Synth	Vetec	Synth
F	5	3	3	5	5	3	3	5
G	Lab 1	Lab2	Lab2	Lab 1	Lab2	Lab 1	Lab 1	Lab2

Parâmetros alterados: A: comprimento de onda (nm); B: Cubeta (mL); C: Filtração; D: Marca do fosfato dibásico de potássio; E: Marca do fosfato monobásico de potássio; F: Tempo de ultrassom (min); G: Fonte de água.

[a:] Condição normal.

A robustez foi avaliada por meio do efeito que cada alteração exerceu sobre os resultados, considerando que o método é robusto quando o efeito for menor que DPR vezes a raiz de 2, de acordo com Youden & Steiner (1975).

6.3.4.7.Doseamento

O doseamento também foi realizado, apesar de não ser um parâmetro de validação, para obter o teor de fármaco e comprovar se o mesmo encontra-se dentro das especificações (JP, 2011).

Para o doseamento foram pesados 0,00519 g de vancomicina SQR e 0,00505 g de vancomicina pó liofilizado (equivalente a 5 mg de vancomicina) e transferidos para balões volumétricos de 25 mL cada e adicionou-se a solução tamponante pH 6,8. Ambas as soluções foram mantidas em banho ultrassônico por 5 minutos e então o volume dos balões foram completados com o mesmo diluente. Alíquotas de 2,5 mL foram tomadas de cada solução e transferidas para balões volumétricos de 5 mL, de forma a obter uma solução de trabalho de 100 µg/mL. Estas soluções foram lidas a 280 nm e o teor foi determinado conforme as Equação 5.

$$\text{Ca: } \frac{Abs\ x\ CSQR}{Absr} \qquad\qquad \text{Ca\%: } \frac{Ca\ x\ 100}{Ct}$$

Equação 5. Cálculo do teor de vancomicina amostra.

Ca: Concentração de vancomicina amostra
CSQR: Concentração de vancomicina SQR
Ct: Concentração teórica de vancomicina amostra
Abs: Absorbância de vancomicina amostra
Absr: Absorbância de vancomicina SQR.

6.3.5. Resultados

6.3.5.1.Curva de Ringbom

Os valores de absorbância obtidos para a construção da curva de Ringbom encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12. Valores de absorvância obtidos para construção da curva de Ringbom para vancomicina

Concentração (µg/mL)	Absorvância[a]	100 - % de Transmitância
10	0,055	11,963
15	0,078	16,440
20	0,105	21,537
30	0,139	27,389
40	0,196	36,272
50	0,239	42,368
60	0,305	50,455
70	0,348	55,091
80	0,387	58,948
90	0,435	63,300
100	0,477	66,657
110	0,516	69,544
120	0,585	73,998
130	0,621	76,067
140	0,662	78,240
150	0,722	81,033
160	0,764	82,781
170	0,801	84,175
180	0,859	86,164
190	0,922	88,042
200	0,979	89,505
220	1,035	90,774
240	1,139	92,745
260	1,258	94,483
280	1,325	95,268
300	1,396	95,985
330	1,561	97,254
360	1,664	97,832

Tabela 12 (continuação). Valores de absorvância obtidos para construção da curva de Ringbom

Concentração (µg/mL)	Absorvância[a]	100 - % Transmitância
390	1,846	98,574
420	1,938	98,846
450	2,044	99,096
480	2,162	99,311
500	2,207	99,379

[a]: Média de três determinações

O gráfico da curva de Ringbom obtida encontra-se na Figura 13.

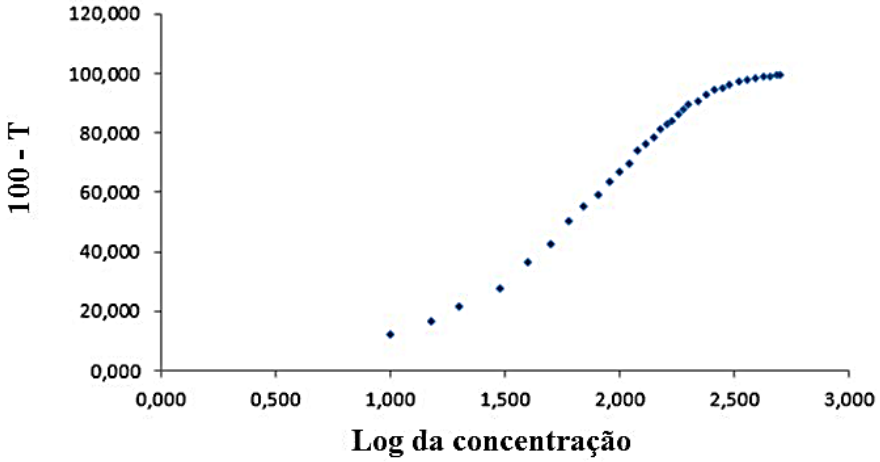

Figura 13. Curva de Ringbom para vancomicina SQR.

6.3.5.2.Seletividade

A Figura 14 representa a sobreposição dos espectros obtidos para vancomicina SQR e pó liofilizado para solução injetável.

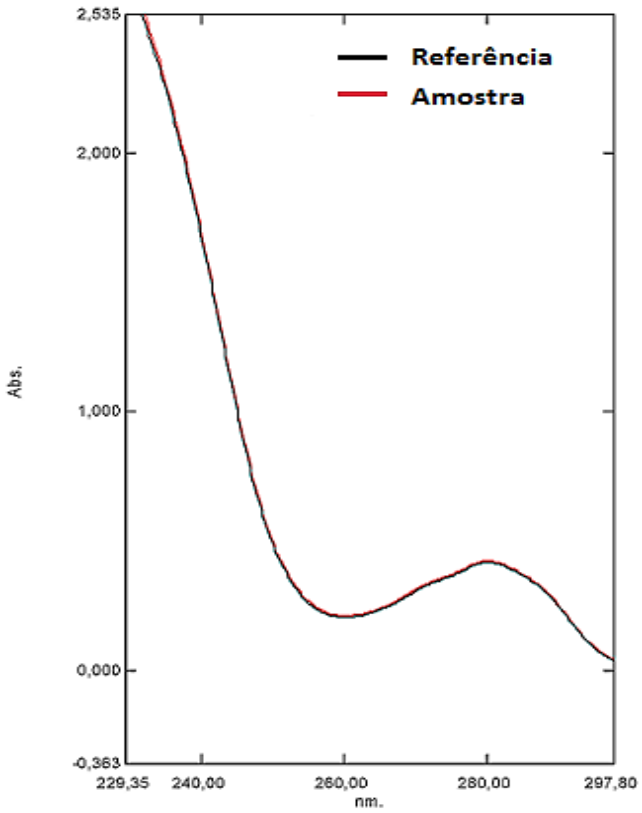

Figura 14. Sobreposição dos espectros obtidos para vancomicina SQR (preto) e pó liofilizado para solução injetável (vermelho) na concentração de 100 µg/mL.

Em relação as condições de estresse, foi feita a sobreposição dos espectros obtidos nos tempos 0 e 8 horas, para as degradações ácida, alcalina, oxidativa e neutra, e 0 e 24 horas para a degradação fotolítica. Estas sobreposições estão representadas nas Figuras de 15, 16, 17, 18 e 19.

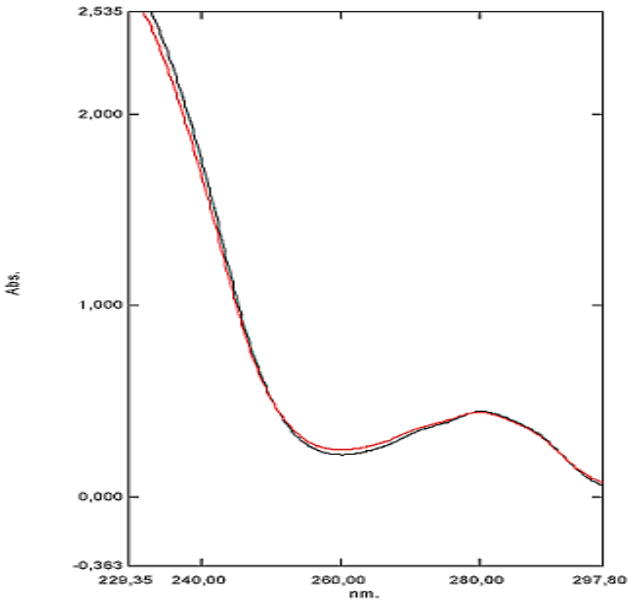

Figura 15. Sobreposição dos espectros obtidos na degradação ácida (HCl 0,01 M – 60 ºC) nos tempos 0 (preto) e 8 horas (vermelho) para vancomicina pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região do UV.

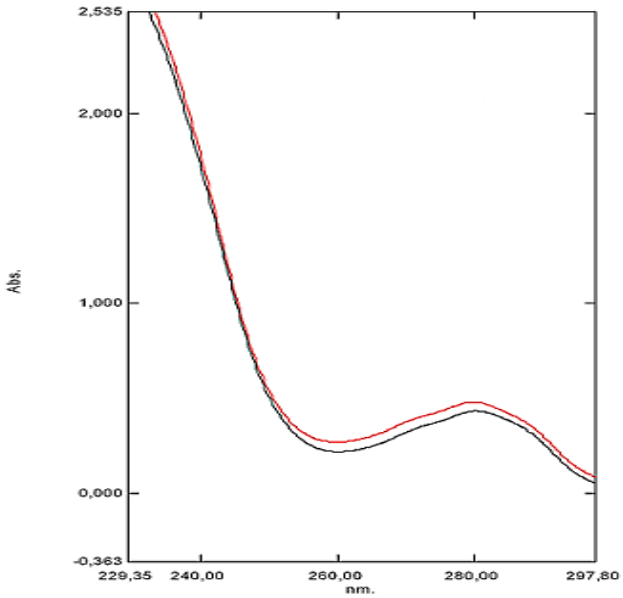

Figura 16. Sobreposição dos espectros obtidos na degradação alcalina (NaOH 0,1 M – 60 ºC) nos tempos 0 (preto) e 8 horas (vermelho) para vancomicina pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região do UV.

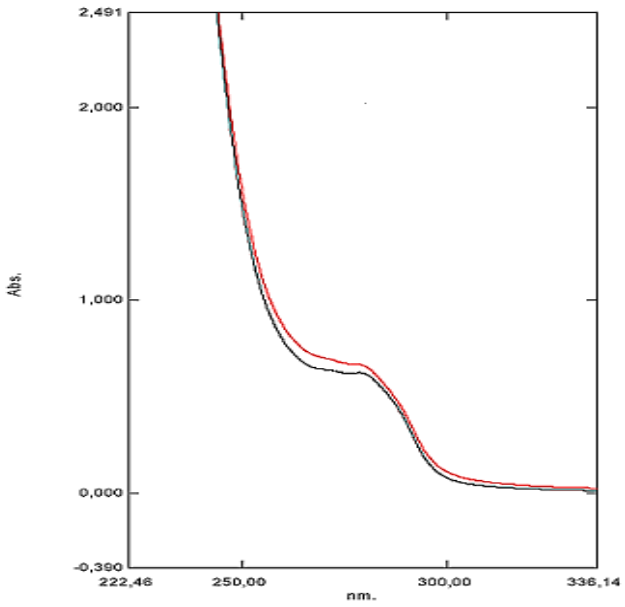

Figura 17. Sobreposição dos espectros obtidos na degradação oxidativa (H_2O_2 0,3 % – 60 ºC) nos tempos 0 (preto) e 8 horas (vermelho) para vancomicina pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região do UV.

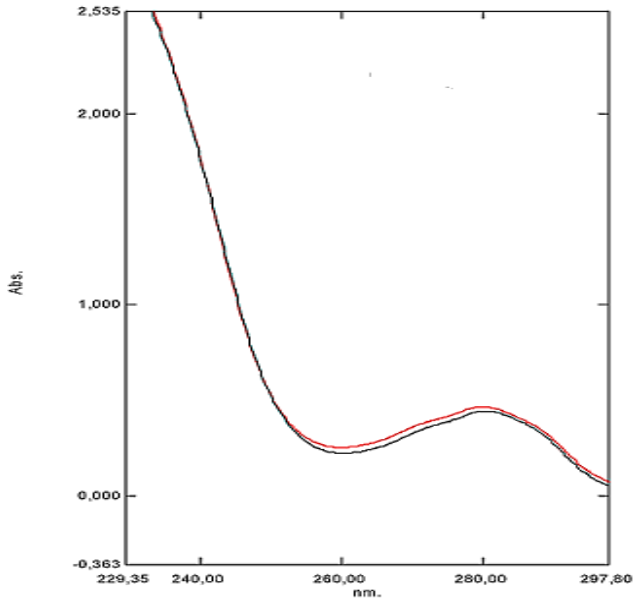

Figura 18. Sobreposição dos espectros obtidos na degradação neutra (água purificada – 60 ºC) nos tempos 0 (preto) e 24 horas (vermelho) para vancomicina pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região do UV.

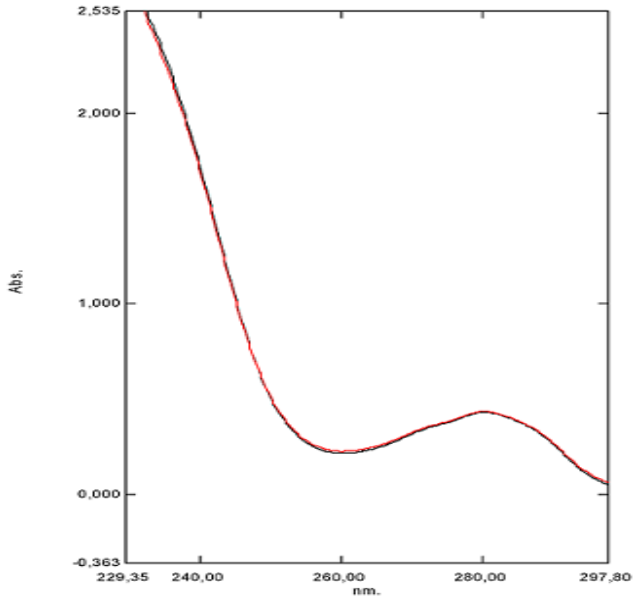

Figura 19. Sobreposição dos espectros obtidos na degradação fotolítica (solução tamponante pH 6,8 – 254 nm) nos tempos 0 (preto) e 24 horas (vermelho) para vancomicina pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região do UV.

Os valores de degradação obtidos para cada condição estão presentes na Tabela 13.

Tabela 13. Valores de degradação de vancomicina pó liofilizado pelo método espectrofotométrico na região do UV proposto

Condição de degradação	Absorvância no tempo 0	Absorvância no tempo 8 h/24 h*	Porcentagem não degradada (%)	Porcentagem de degradação (%)
Ácida (HCl 0,01 M – 60 ºC)	0,448	0,441	98,44	1,56
Alcalina (NaOH 0,1 M – 60 ºC	0,450	0,422	93,78	6,22
Oxidativa (H_2O_2 0,3 % - 60 ºC	0,626	0,595	95,05	4,95
Neutra (água – 60 ºC)	0,446	418	93,72	6,28
Fotolítica (UV a 254 nm)	0,443	0,414	93,45	6,55

*Tempo de 24 horas apenas para degradação fotolítica

6.3.5.3.Linearidade

A curva analítica construída para vancomicina referência foi obtida a partir da média de três curvas analíticas nas concentrações de 50 a 150 µg/mL, obtidas durante o ensaio da linearidade.

A equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrado foi y= 0,0044x + 0,0018, com coeficiente de determinação de 0,9994 e decorrelação (r) igual a 0,9997 para vancomicina SQR.

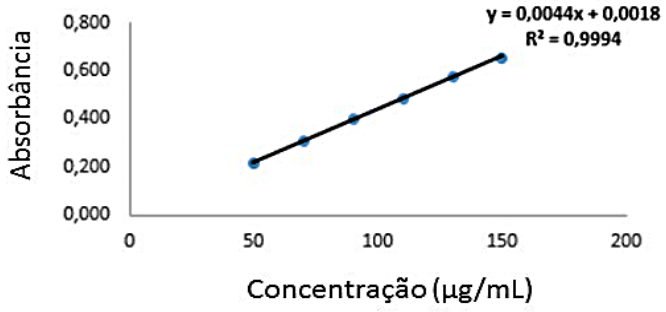

Figura 20. Curva analítica para vancomicina referência nas concentrações de 50, 70, 90, 110, 130 e 150 µg/mL, obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV a 280 nm.

A ANOVA foi calculada para os dados das curvas analíticas de vancomicina referência e está representada na Tabela 14.

Tabela 14. Análise de variância obtida para os valores de absorvância determinados nas curvas analíticas para vancomicina referência, para o método espectrofotométrico na região do UV

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	Fcalc	Ftab
Entre	5	0,40700	0,08140	277,50*	3,11
Regressão linear	1	0,40648	0,40648	1385,72*	4,75
Desvio de linearidade	4	0,00052	0,00013	0,44	3,26
Resíduo	12	0,00029	0,00002	-	-
Total	17	0,40729	-	-	-

*Significativo para p<0,05

A análise da dispersão de resíduos foi realizada através do respectivo gráfico, presente na Figura 21.

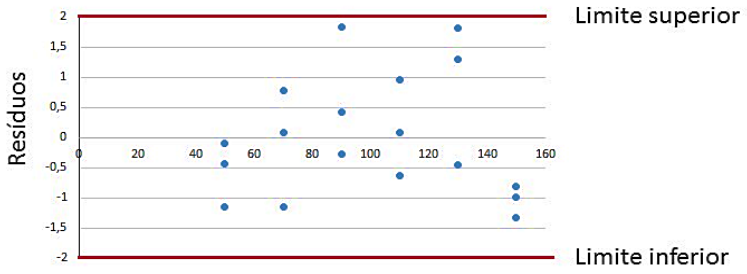

Figura 21. Gráfico de dispersão dos resíduos para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do UV.

6.3.5.4.Limites de detecção e de quantificação

Os valores obtidos para LD e LQ foram, respectivamente, 0,723 e 2,192 µg/mL.

6.3.5.5.Precisão

Os valores obtidos para a precisão intradia, interdias e intermediária, assim como os testes estatísticos de ANOVA e Teste F e Teste t, encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15. Valores de precisão intradia, interdias e intermediária, ANOVA e Testes F e t para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do UV

280 nm	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**DPR (%)**
Precisão intradia	0,408	0,408	0,395	0,404	0,413	0,394	1,90
Precisão interdias	0,404	0,402	0,399	0,405	0,390	0,392	0,88
Precisão intermediária	0,400	0,390	0,390	0,392	0,395	0,394	1,51
	ANOVA		**Test F**		**Test t**		
	Fcrít: 4,38		Fcrit: 5,05		Tcrit: 2,22		
	Fcal: 1,63		Fcal: 2,43		Tcal: 2,10		

6.3.5.6.Exatidão

A exatidão foi obtida pelo método de recuperação e os valores obtidos para os três dias e para cada concentração encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16. Recuperação obtida para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do UV

	Vancomicina SQR adicionada (µg/mL)	Vancomicina SQR recuperada (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
R1	30	30,14	100,47		
R2	50	50,79	101,57	101,10	0,50
R3	70	70,87	101,25		

6.3.5.7.Robustez

O método de Youden & Steiner (1975) foi aplicado paraa avaliação dos resultados darobustez e os efeitos obtidos para cada variação encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17. Resultados obtidos na robustez do método espectrofotométrico na região do UV para vancomicina

Parâmetro	Efeito	Desvio padrão global	DPR x raiz de 2
A	2,84		
B	-0,23		
C	0,91		
D	-1,70		
E	1,70	**2,29**	**3,25**
F	0,91		
G	-1,70		

Parâmetros alterados: A: Comprimento de onda (nm); B: Cubeta (mL); C: Filtração; D: Marca do fosfato dibásico de potássio; E: Marca do fosfato monobásico de potássio; F: Tempo de ultrassom (min); G: Fonte de Água.

6.3.5.8.Doseamento

O doseamento foi realizado para vancomicina SQR em três dias diferentes, os valores médios e DPR (%) obtidos encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18. Doseamento para vancomicina para o método espectrofotométrico na região do UV

Dia	Teor médio (%)	Teor final (%)	DPR (%)
1	94,56		
2	96,12	**95,65**	**0,99**
3	96,26		

6.3.6. Discussão

A espectrofotometria é uma técnica que mede a interação entre as moléculas com radiação eletromagnética. A energia da luz é utilizada para promover os elétrons de um estado de energia mais baixo para o estado mais excitado, e um espectro é obtido quando a absorção de luz é medida em função de sua frequência ou comprimento de onda (SCHMID, 2001). A espectrofotometria é frequentemente utilizada em indústrias de refino, petroquímicas, química fina, materiais e farmacêuticas (ALÉSSIO; KOGAWA; SALGADO, 2017; RECHELO; KOGAWA; SALGADO, 2017; BRBAKLIC; KOGAWA; SALGADO, 2017; KOGAWA; SALGADO, 2016; KOGAWA; SALGADO, 2013). Técnicas ópticas são muito úteis, pois permitem o acesso ao processo para controle em tempo real, o que é fundamental para manter as melhores condições de produção (OJEDA, 2009).

A seletividade do método foi confirmada pela comparação entre os espectros obtidos para a vancomicina referência e amostra. Como a vancomicina pó liofilizado para solução injetável não apresenta adjuvantes em sua composição, apenas os espectros da substância de referência e amostra foram sobrepostos e observa-se que ambos possuem absorção máxima no mesmo comprimento de onda, com perfis semelhantes. A seletividade também pode ser comprovada através dos espectros obtidos na degradação forçada, pois, sob condições de estresse extremo o fármaco é degradado e pode ocorrer a formação destes produtos de degradação que absorver luz no mesmo comprimento de onda e interferir na quantificação do fármaco (KOGAWA; SALGADO, 2016). Para o método proposto não houve o aparecimento de novas bandas e observou-se a degradação do fármaco, desta forma, pode-se concluir que o método é seletivo frente as condições de degradação realizadas.

Durante o desenvolvimento do método foram realizadas leituras de soluções de concentração entre 10 e 500 µg/mL, obtendo assim a curva de Ringbom. A partir destes dados foram escolhidas seis concentrações (50, 70, 90, 110, 130 e 150 µg/mL) que apresentaram linearidade, ou seja, apresentaram coerência entre o aumento da concentração de fármaco em relação ao aumento dos valores de absorbância.

Para confirmar a linearidade do método, um gráfico de resposta versus concentração foi construído o obteve-se a equação da reta y = 0,0044x + 0,0018, com coeficiente dedeterminação de 0,9994 e de correlação igual a 0,9997, estando de acordo com o estabelecido pela legislação (BRASIL, 2017). Ainda, o cálculo da análise de variância (ANOVA) que revelou haver regressão linear entre as concentrações e desvio de linearidade não significativo. O gráfico de dispersão dos resíduos também confirmou a linearidade do método para as concentrações utilizadas, onde os pontos ficaram dentro dos limites estipulados de -1,96 a 1,96 (Horwitz et al., 1980) e valor de p significativo (p=0,777) para nível de confiança de no mínimo 95 %.

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos a partir dos coeficientes lineares e angulares de cada uma das três equações da reta e aplicando-se as equações 3 e 4 que foram, respectivamente, 0,723 e 2,192 µg/mL.

A precisão foi determinada pelo método de repetibilidade, para o qual foram preparadas seis soluções e realizadas seis leituras no mesmo dia, pelo mesmo analista e sob as mesmas condições de trabalho do método, obtendo-se valor de DPR igual a 1,90 %, considerado aceitável e preciso. Também foi determinada a precisão intermediária, a qual foi realizada em dias diferentes e por outro analista, mantendo as condições de trabalho, obtendo-se DPR igual a 1,51 %. Ambas as precisões determinadas se mostraram adequadas por apresentarem DPR abaixo de 2 % e ainda a ANOVA foi realizada para a precisão interdias, obtendo-se valor de Fcalculado menor que Fcrítico (Fcal=1,63, Fcrít=4,39), comprovando que há precisão em dias diferentes. Teste-F e Teste-t foram realizados para a análise da precisão intermediária onde o valor de Tcal foi menor que Tcrít (Tcal=2,11, Tcrít=2,23), o que comprova a precisão do método.

A exatidão realizada pelo método de recuperação de padrão foi realizada em três níveis de concentração, compreendendo 80, 100 e 120 %, e em três dias diferentes. Os valores de recuperação para cada um dos dias mostraram-se satisfatórios e a média destes três dias foi igual a 101,10 %, estando de acordo com o preconizado, 100±2 % (AOAC, 2002).

A robustez realizada pelo método de Youden-Steiner foi realizada escolhendo-se sete parâmetros considerados importantes para o método, os quais sofreram pequenas variações, agrupadas em oito experimentos. O cálculo do efeito de cada variação para cada parâmetro foi realizado e o mesmo comparado com DPR vezes a raiz de 2 (3,24). Todos os parâmetros analisados apresentaram efeitos abaixo deste valor, sendo que o comprimento de onda foi o parâmetro que apresentou maior efeito, mas também está abaixo do valor de comparação, ou seja, o método pode ser considerado robusto frente às alterações realizadas.

O doseamento foi realizado em três dias diferentes de forma a obter o teor do fármaco e confirmar se este encontra-se de acordo com o estabelecido em sua monografia de 90 - 115 % (JP, 2011). O teor médio obtido foi de 95,65 % e considerado adequado.

O método espectrofotométrico na região do UV proposto para vancomicina pó liofilizado para solução injetável mostrou-se adequado, considerando os parâmetros avaliados e pode ser considerado validado, podendo ser aplicado para a quantificação deste fármaco, nesta forma farmacêutica, além disso, este método compreende os princípios da Química Analítica Verde devido à menor quantidade de fármaco utilizado,bem como a redução do volume de diluente também utilizado, gerando menos resíduos para o meio ambiente.

6.4. Espectrofotometria na região do infravermelho

6.4.1. Material

Vancomicina referência e pó liofilizado para solução injetável (descritos nos itens 4.1 e 4.2) foram submetidos à análise. As pastilhas foram preparadas utilizando brometo de potássio (KBr) como diluente, sendo que este foi mantido em estufa a 105ºC por, no mínimo, 24 horas antes de seu uso. Foi preparado um *pool* contendo vancomicina referência ou amostra e KBr, na proporção de 1:10. Os pós foram transferidos para um almofariz e pistilo de ágata e triturados. Após esta etapa, foi feita a transferência para o equipamento de compressão, para a obtenção das pastilhas, e os resultados foram obtidos utilizando o software IR- Solution®. Outros materiais utilizados foram balança analítica Discovery, Ohaus® (São Paulo, Brasil) modelo DV215CD e estufa de secagem e esterilização Fanem® (São Paulo, Brasil) modelo 315 SE.

Considerando a estrutura da vancomicina e o espectro obtido, buscou-se encontrar uma banda que correspondesse à um grupo característico do fármaco. A banda na região de 1450-1375 cm^{-1} equivale ao grupamento CH_3 dimetil dupleto, presente apenas na estrutura da vancomicina, caracterizada por duas bandas de intensidade quase iguais e dobramento aproximadamente em 1375 cm^{-1}, portanto esta banda foi escolhida para a quantificação da vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.

6.4.2. Método

Foram realizados os parâmetros analíticos para validação de acordo com o especificado na RDC 166 (2017) que são sensibilidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

6.4.3. Validação

6.4.3.1.Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da sobreposição dos espectros obtidos para vancomicina SQR e pó liofilizado para solução injetável.

6.4.3.2.Linearidade

A linearidade foi determinada por meio da construção de três curvas analíticas, desenvolvidas em três dias diferentes e em triplicata, nas concentrações de 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 ;1,8 e 2,0 mg/150 mg. Foi feita a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, análise de variância (ANOVA) e a construção do gráfico de dispersão dos resíduos.

Foi preparado um *pool* de vancomicina amostra, pesando-se 0,054 g de amostra e 0,486 g de KBr, na proporção de 1:10. A partir deste *pool* foram pesadas as massas correspondentes as concentrações de 1,0 a 2,0 mg/150 mg e, para completar a massa de 150 mg de cada pastilha, foi pesado o valor correspondente de KBr. Após a pesagem, as massas pesadas foram transferidas para um almofariz e pistilo de ágata e misturados. O conteúdo foi transferido para o sistema de compressão e submetidos à compressão de 90 kN por 7 minutos. Após este período, foi feita a leitura da pastilha e obtido o seu espectro.

6.4.3.3.Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos a partir das equações da reta das três curvas analíticas construídas, aplicando-se as equações 1 e 2.

6.4.3.4.Precisão

A precisão foi realizada pela repetibilidade, em que seis pastilhas foram preparadas na concentração de 1,6 mg/150 mg de vancomicina pó liofilizado. A precisão interdiasfoi realizada da mesma forma, mas em dias diferentes. A precisão intermediária foi realizada em dias diferentes e por outro analista, sob as mesmas condições de análise. Para o preparo das pastilhas foi pesado, a partir do *pool* de vancomicina amostra, 16 mg, e 134 mg de KBr para completar a massa da pastilha e deu-se seguimento ao procedimento de obtenção das pastilhas.

6.4.3.5.Exatidão

A exatidão foi realizada de acordo com o método de recuperação de padrão em que, pastilhas de vancomicina pó liofilizado adicionadas de SQR foram preparadas na mesma concentração (1,0 mg/150 mg) e em três níveis (R1, R2 e R3), compreendendo 80, 100 e 120%.

Para o preparo de R1, R2 e R3 manteve-se a mesma concentração de amostra igual a 1,0 mg/150 mg e variou apenas a concentração de vancomicina SQR sendo adicionados, respectivamente, 0,28; 0,60 e 0,92 mg de padrão.

Foram pesados 0,0300g de vancomicina SQR e 0,2700 g de KBrpara o preparo do *pool* de vancomicina referência e, 0,0303 g de vancomicina pó liofilizado e 0,2723 g de KBr, para o *pool* de amostra. A partir destes *pools* foram pesadas as massas necessárias para o preparo das pastilhas de vancomicina referência, amostra, R1, R2 e R3. A Tabela 19 evidencia as concentrações utilizadas na exatidão.

Tabela 19. Preparo das pastilhas de vancomicina para exatidão pelo método espectrométrico na região do infravermelho

	Vancomicina amostra (mg/150 mg)	**Vancomicina SQR (mg/150 mg)**	**Concentração final teórica (mg/150 mg)[a]**
Amostra	1,00	-	1,00
R1	1,00	0,28	1,28
R2	1,00	0,60	1,60
R3	1,00	0,92	1,92
Referência	-	1,00	1,00

[a]Cada nível foi preparado em triplicata

6.4.3.6.Robustez

A robustez foi realizada através de variações em três parâmetros escolhidos: força de compressão (kN), tempo de compressão (minutos) e marca de KBr. Os resultados foram avaliados através de Testes F e t. A Tabela 20 apresenta as variações que foram realizadas.

Tabela 20. Parâmetros alterados para robustez para o método proposto

Parâmetro	**Condição normal**	**Condição alterada**	
Força de compressão (kN)	90	92	88
Tempo de compressão (min)	7	9	5

Marca KBr	Neon	Dinâmica

6.4.4. Resultados

6.4.4.1.Seletividade

A seletividade foi obtida pela sobreposição dos espectros obtidos para vancomicina SQR e pó liofilizado. A Figura 22 apresenta a sobreposição destes espectros.

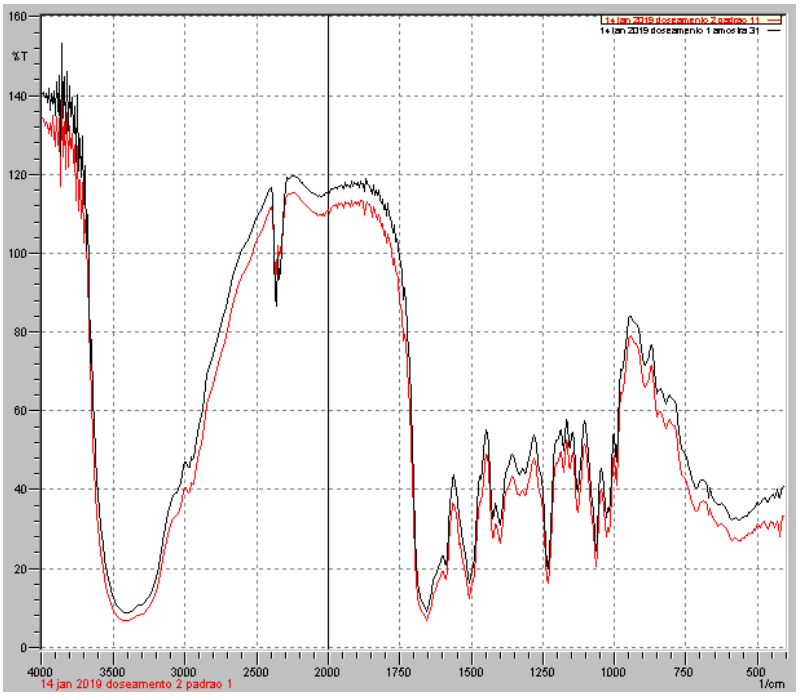

Figura 22. Sobreposição dos espectros obtidos para vancomicina SQR e pó liofilizado para solução injetável na concentração de 1,6 mg/150 mg.

6.4.4.2.Linearidade

A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos para a linearidade nas concentrações de 1,0; 1,2; 1,4;1,6; 1,8 e 2,0 mg/150 mg de vancomicina SQR e a Figura 23 mostra a curva analítica correspondente.

Tabela 21. Valores de absorvância obtidos para vancomicina referência usando o método espectrofotométrico na região do UV proposto

Concentração (mg/150 mL)	Absorvância	Média das absorvâncias	DPR (%)

1,0	0,388		
	0,374	0,381	1,84
	0,381		
1,2	0,455		
	0,474	0,463	2,15
	0,459		
1,4	0,553		
	0,544	0,544	1,50
	0,536		
1,6	0,612		
	0,619	0,611	1,37
	0,602		
1,8	0,709		
	0,693	0,699	1,17
	0,697		
2,0	0,759		
	0,774	0,766	1,01
	0,765		

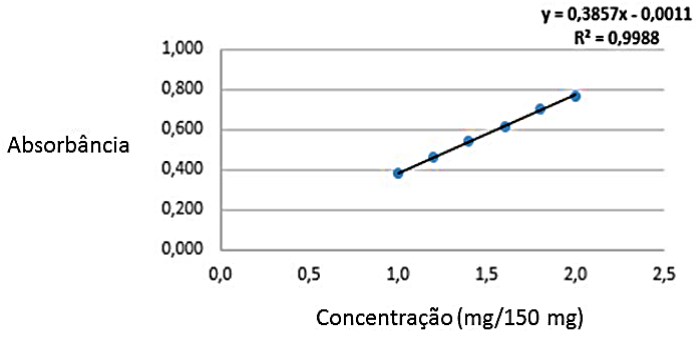

Figura 23. Curva analítica para vancomicina referência nas concentrações de 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2,0 mg/150 mg, obtida pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho na região de 1450-1375 1/cm.

A equação da reta obtida para as concentrações de 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2,0 mg/150 mg foi y= 0,3857x – 0,0011, com coeficiente de determinação igual a 0,9988 e decorrelação (r) igual a 0,9994, para vancomicina referência.

Para confirmar a linearidade do método foram realizadas a análise de variância (ANOVA) e a construção do gráfico de dispersão de resíduos. Os resultados obtidos para a análise estatística e o gráfico de resíduos encontram-se na Tabela 22 e na Figura 24, respectivamente.

Tabela 22. Análise de variância obtida para os valores de absorvância determinados nas curvas analíticas para vancomicina referência, para o método espectrofotométrico na região do infravermelho

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	Fcalc.	Ftab.
Entre	5	0,31343	0,06269	74,45*	3,11
Regressão linear	1	0,31266	0,31266	371,33*	4,75
Desvio de linearidade	4	0,00078	0,00019	0,23	3,26
Resíduo	12	0,00084	0,00007	-	-
Total	17	0,31428	-	-	-

*Significativo para p<0,05

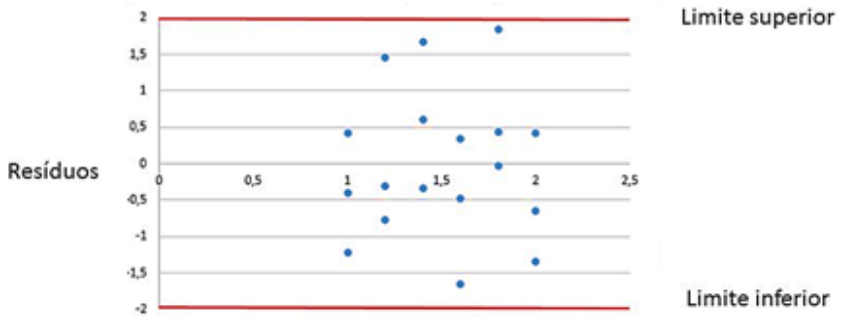

Figura 24. Gráfico de dispersão dos resíduos para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho.

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

Os valores obtidos para LD e LQ foram, respectivamente, 0,009 e 0,028 mg/150 mg

6.4.4.4.Precisão

A precisão por repetibilidade foi analisada quanto ao DPR (%), a interdias pela análise de variância (ANOVA) e a intermediária por meio de Teste F e Teste t. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 23.

Tabela 23. Valores de precisão intradia, interdias e intermediária, ANOVA e Teste F e Teste t para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho

1450 – 1375 1/cm	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**DPR (%)**
Precisão intradia	0,583	0,600	0,605	0,623	0,603	0,590	2,29
Precisão interdias	0,612	0,619	0,599	0,610	0,626	0,625	1,69
Precisão intermediária	0,634	0,633	0,623	0,607	0,661	0,654	3,12
	ANOVA		**Test F**		**Test t**		
	Fcrít: 4,38		Fcrit: 5,05		Tcrit: 2,23		
	Fcal: 0,39		Fcal: 3,73		Tcal: 2,21		

6.4.4.5.Exatidão

A exatidão foi realizada pelo método de recuperação de padrão e os resultados encontram-se na Tabela 24.

Tabela 24. Recuperação obtida para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho

	Vancomicina referência adicionada (mg/150 mg)	**Vancomicina referência recuperada (mg/150 mg)**	**Recuperação (%)**	**Recuperação média (%)**	**DPR (%)**
R1	0,28	0,28	99,65		
R2	0,60	0,60	99,48	99,37	0,32
R3	0,92	0,91	98,98		

6.4.4.6.Robustez

A robustez foi avaliada através da variação de três parâmetros e foram realizados Teste F e Teste t para verificar se essas alterações realizadas são capazes de interferir nos resultados do método. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 25.

Tabela 25. Resultados da robustez obtida para vancomicina pelo método espectrofotométrico na região do infravermelho proposto

Parâmetro		1	2	3	Fcrit	Fcal	Tcrit	Tcal
Força de	**92 kN**	0,638	0,640	0,635	19	2,26	2,77	-1,27
compressão	**88 kN**	0,631	0,623	0,625	19	1,21	2,77	-2,46
Tempo de	**9**	0,610	0,589	0,604	19	8,39	2,77	-0,75
compressão	**5**	0,642	0,623	0,623	19	8,16	2,77	-5,04
Marca de	**Dinâmica**	0,698	0,667	0,665	19	3,30	2,77	-13,36
KBr								

6.4.4.7.Doseamento

Também foi realizado o doseamento para vancomicina referência na concentração de 1,6 mg/ 150 mg em três dias diferentes. Os resultados estão presentes na Tabela 26.

Tabela 26. Doseamento da vancomicina usando o método espectrofotométrico na região do infravermelho proposto

Dia	Teor médio (%)	Teor final (%)	DPR (%)
1	101,66		
2	101,75	**102,35**	**1,09**
3	103,63		

6.4.5. Discussão

A espectrofotometria na região do infravermelho é uma técnica muito utilizada atualmente tanto para a identificação como quantificação de substâncias, sendo baseada na interação de radiação eletromagnética e as vibrações de ligações químicas entre os átomos do composto de interesse (MORAES et al., 2008; MORENO; SALGADO, 2012; KOGAWA; SALGADO, 2013; DE MARCO; SALGADO, 2016; KOGAWA; SALGADO, 2016;

KOGAWA; SALGADO, 2018; REBOUÇAS; KOGAWA; SALGADO, 2018; NASCIMENTO; KOGAWA; SALGADO, 2019; RECHELO; KOGAWA; SALGADO, 2019).

Para o desenvolvimento do método foi construída uma curva analítica de concentrações 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8 e 2,0 mg/150 mg.

A seletividade do método foi comprovada através da sobreposição dos espectros obtidos para vancomicina referência e pó liofilizado para solução injetável. Observa-se que os espectros se sobrepõem perfeitamente, com todas as bandas características deste fármaco presentes, desta forma, pode-se comprovar a seletividade do método.

A partir da curva analítica, foram escolhidas seis concentrações (1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2,0 mg/150 mg) para a determinação da linearidade do método. A equação da reta obtida foi y= 0,3857x – 0,0011 com coeficiente de determinação igual a 0,9988 e de correlação (r) igual a 0,9994, estando de acordo com o preconizado pela RDC 166 (2017). Também foi feita a análise de variância que demonstrou haver regressão linear significativa e desvio de linearidade não significativo para $p<0,05$. O gráfico de dispersão de resíduos foi construído e o mesmo confirmou a linearidade apresentando resíduos dentro dos limites estipulados -1,96 a 1,96 (Horwitz et al., 1980), com valor de p significativo (p=0,919) para nível de significância de no mínimo 95%.

Os limites de detecção e de quantificação mostraram-se baixos, o que evidencia a sensibilidade do método.

A precisão foi avaliada pela repetibilidade e intermediária. A precisão por repetibilidade foi avaliada quanto ao valor de DPR (%) igual a 2,29, sendo considerado adequado. A precisão interdias foi submetida a ANOVA, onde o Fcalculado. foi maior que Fcrítico (Fcalc= 0,39, Fcrit.= 4,39) e DPR igual a 1,69 %, sendo considerado preciso com desvio abaixo de 2%. A precisão intermediária foi analisada aplicando-se o Teste F e Teste t, obtendo-se valor de Tcalculado menor que Tcrítico (Tcal.= 2,21, Tcrit.= 2,23), com DPR igual a 3,12 %. O método foi considerado preciso, pois, em ambos os casos, apresentou valor adequado na análise estatística e DPR menor que 2%.

A exatidão foi realizada pelo método de recuperação de padrão e apresentou teores aceitáveis nos três dias. O teor médio obtido foi de 99,37 % e é considerado adequado, estando dentro do especificado de 100 ± 2% (AOAC, 2002) e com valor de DPR (%) baixo, desta forma, o método pode ser considerado exato.

A robustez foi analisada aplicando-se os Teste F e Teste t. Os resultados obtidos por estes testes confirmam a robustez do método proposto frente as variações realizadas no parâmetro força de compressão. Entretanto, para mudanças no tempo de compressão, quando a

variação foi para diminuir o tempo de compressão das pastilhas, o método não mostrou ser robusto, o mesmo ocorreu quando a marca de KBr utilizada foi alterada.

O doseamento realizado para o fármaco em estudo apresentou teor médio de 102,35, estando de acordo com o especificado em sua monografia, considerado adequado quando o teor estiver entre 90 a 115 % (JP, 2011).

Todos os parâmetros de validação realizados apresentaram resultados satisfatórios e estando de acordo com os limites especificados pela AOAC (2002), portanto, o método pode ser considerado validado e adequado para a quantificação de vancomicina pó liofilizado para solução injetável.

6.5. Cromatografia líquida de alta eficiência

6.5.1. Material

Vancomicina referência e pó liofilizado para solução injetável (descritos nos itens 4.1 e 4.2) foram submetidos à análise. Para o preparo das soluções foi utilizada balança analítica Discovery Ohaus® (São Paulo, Brasil) modelo DV215CD solução tamponante fosfato de potássio pH 6,8que foram filtradas em seringas com filtro de 0,45 µm. A fase estacionária utilizada foi a coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) e fase móvel composta por água + 0,1% de ácido acético: etanol (85:15, v/v) vazão de 0,5 mL/min, volume de injeção de 20 µL e leitura em 280 nm. As soluções de vancomicina e a fase móvel foram submetidas a banho ultrassônico Ultrasonic Cleaner Unique® (Indaiatuba, Brasil). O método foi desenvolvido e validado em cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters® composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters® 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detector UV-VIS Waters® 2487.

6.5.2. Método

Os parâmetros analíticos seletividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão, e robustez foram realizados de acordo com o especificado (AOAC, 2002; HORWITZ et al., 1980) e na RDC 166 (2017). Além disso, o doseamento para vancomicina também foi realizado a fim de comprovar seu teor e se o mesmo se encontrada dentro dos limites estipulados de 90 a 115% (JP, 2011).

6.5.3. Validação

6.5.3.1.Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da sobreposição dos cromatogramas obtidos para vancomicina referência e pó liofilizado para solução injetável. Foi realizado também o estudo de degradação forçada, onde soluções de vancomicina pó liofilizado foram submetidas a condições de estresse, sendo elas: ácida (HCl 0,01M), alcalina (NaOH 0,01M), oxidativa (H_2O_2 0,3%), neutra (água) e fotolítica (luz UV a 254 nm). Foram pesados 0,02019 g de vancomicina pó liofilizado (equivalente à 20 mg de vancomicina) e transferidos para balão volumétrico de 100 mL contendo solução tamponante pH 6,8 e mantido em banho ultrassônico por 5 minutos. Após esse tempo o volume do balão volumétricofoi completado com o mesmo diluente, obtendo-se solução na concentração teórica de 200 µg/mL. A partir desta solução estoque foram tomados 12,5 mL e transferidos para frasco de vidro transparente e adicionados 12,5 mL das soluções degradantes, obtendo-se uma concentração final de 100 µg/mL. Os frascos de degradação ácida, básica, oxidativa e neutra foram mantidos em banho de aquecimento a 60ºC, enquanto que a degradação fotolítica foi realizada em câmara com luz UV a temperatura ambiente. Alíquotas foram tomadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas para a degradação fotolítica e até oito horas para as demais. Foi realizada a sobreposição dos espectros nos tempos inicial e final para cada condição e os mesmos foram analisados.

6.5.3.2.Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir da construção de três curvas analíticas em triplicata e em três dias diferentes, nas concentrações de 40 a 140 µg/mL de vancomicina SQR.

Foram pesados 0,00519 g de vancomicina referência (equivalente à 5 mg de vancomicina) e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL contendo solução tamponante pH 6,8. Este balão foi mantido em banho ultrassônico por 5 minutos e após este tempo o volume foi completado com o mesmo diluente, obtendo-se uma solução de 200 µg/mL. Alíquotas foram tomadas a partir desta solução estoque e transferidas para balão volumétrico de 5 mL para obtenção das concentrações de 40, 60, 80, 100, 120 e 140 µg/mL. Estas soluções de trabalho foram filtradas e injetadas no sistema cromatográfico.

Foi obtida a equação da reta desta curva analítica e o coeficiente de correlação por meio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A ANOVA também foi realizada, assim como a construção do gráfico de dispersão de resíduos.

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

O limite de detecção foi determinado a partir das três curvas analíticas e aplicando-se a equação 1. O limite de quantificação foi determinado da mesma forma, mas utilizando-se a equação 2.

6.5.3.4.Precisão

A precisão foi determinada pelo método de repetibilidade e a precisão intermediária. Para o preparo das soluções foram pesados 0,010096 g de vancomicina pó liofilizado para solução injetável (equivalente à 10 mg de vancomicina) e transferido para balão volumétrico de 50 mL adicionado de solução tamponante pH 6,8 e submetido a banho ultrassônico por 5 minutos. O volume do balão foi completado com a mesma solução tamponante, obtendo-se uma solução de concentração teórica de 200 µg/mL. Uma alíquota de 2,5 mL foi tomada desta solução estoque e transferida para um balão volumétrico de 5 mL e completado com o mesmo diluente, obtendo-se a solução de trabalho na concentração de 100 µg/mL. Foram realizadas seis injeções de soluções estoque diferentes e na mesma concentração (100 µg/mL). A precisão intermediária foi realizada sob as mesmas condições, apenas alterando o analista e em dias diferentes. O DPR (%) foi avaliado e ANOVA foi utilizada para a determinação da precisão interdias e Teste F e Teste t para precisão intermediária.

6.5.3.5.Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método de recuperação de padrão. Foram preparadas soluções de vancomicina SQR e pó liofilizado para solução injetável na concentração de 1000 µg/mL. A partir desta solução estoque foram tomadas alíquotas de 400 µL para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se assim soluções de vancomicina SQR e pó liofilizado na concentração de 40 µg/mL cada. Para o preparo de R1, R2 e R3 (80,100 e 120%) o mesmo volume de solução de vancomicina pó liofilizado foi adicionado (400 µL) alterando-se apenas os volumes de vancomicina referência, sendo R1= 400 µL, R2= 600 µL e R3= 800 µL. As concentrações utilizadas para obtenção da exatidão encontram-se na Tabela 27.

Tabela 27. Preparo das soluções de vancomicina para exatidão do método cromatográfico proposto

	Vancomicina amostra (µg/mL)	**Vancomicna referência (µg/mL)**	**Concentração final teórica (µg/mL)[a,b]**
Amostra	40	-	40
R1	40	40	80
R2	40	60	100
R3	40	80	120
Referência	-	40	40

[a]Diluída para balão volumétrico de 10 mL; [b]Cada nível foi preparado em triplicata

6.5.3.6.Robustez

A robustez do método foi determinada pelo método de Youden & Steiner (1975) em que sete parâmetros considerados importantes no método sofrem pequenas variações, organizadas em oito experimentos. Os efeitos exercidos por cada parâmetro foram avaliados e foi considerado robusto quando os efeitos foram menores que o desvio padrão global vezes a raiz quadradade dois. A Tabela 28 apresenta os parâmetros escolhidos e as variações realizadas.

Tabela 28. Parâmetros alterados na robustez e avaliados pelo método de Youden & Steiner (1975) usando o método cromatográfico proposto

	Experimento							
Parâmetro	1[a]	2	3	4	5	6	7	8
A	280	280	280	280	282	282	282	282
B	0,1	0,1	0,08	0,08	0,1	0,1	0,08	0,08
C	*b*	*c*	*b*	*c*	*b*	*c*	*b*	*c*
D	85:15	85:15	87:13	87:13	87:13	87:13	85:15	85:15
E	5	3	5	3	3	5	3	5
F	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5
G	Lab 1	Lab2	Lab2	Lab 1	Lab2	Lab 1	Lab 1	Lab2

Parâmetros alterados: A: Comprimento de onda (nm); B: Concentração de ácido na fase móvel (%); C: Marca do etanol; D: Proporção de fase móvel; E: Tempo de ultrassom (min); F: Vazão (mL/min); G: Fonte de água.

[a]: Condição normal; [b:] Panreac®; [c:] Honeywell®

Condição normal: fase móvel: água + 0,1 % ácido acético: etanol (85:15, v/v) com vazão de 0,5 mL/min.

6.5.4. Resultados

Seletividade

A seletividade foi obtida através da sobreposição dos cromatogramas obtidos para vancomicina referência e pó liofilizado e também pelo estudo de degradação forçada. Os cromatogramas da vancomicina referência e amostra estão representados na Figura 25. Os cromatogramas obtidos na degradação forçada nas condições ácida, alcalina, oxidativa, neutra e fotolítica foram sobrepostos nos tempos 0 e 24 horas, para degradação fotolítica, e 0 e 8 horas para as demais degradações e estão presentes nas Figuras de 26 a 30, respectivamente.

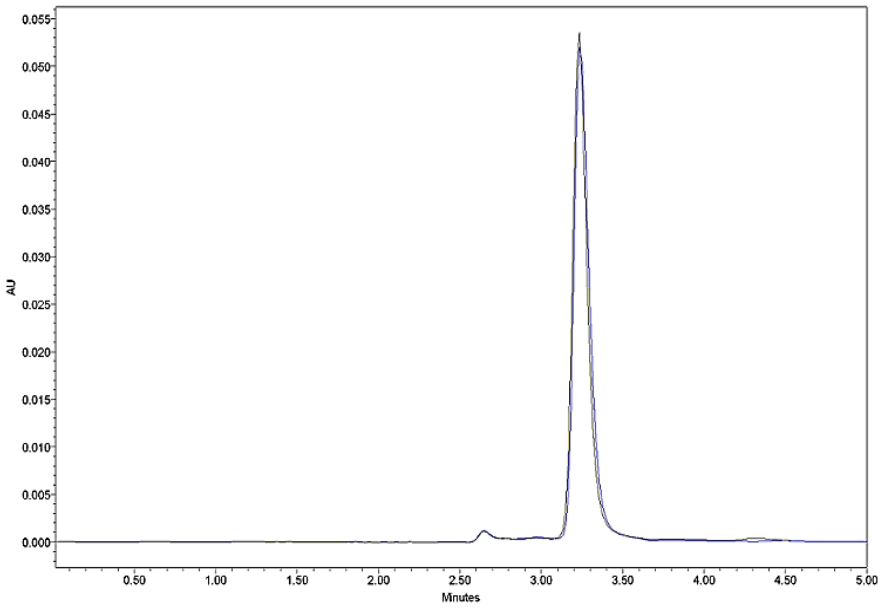

Figura 25. Sobreposição dos cromatogramas obtidos para vancomicina referência (azul) e pó liofilizado (preto) pelo método cromatográfico proposto.

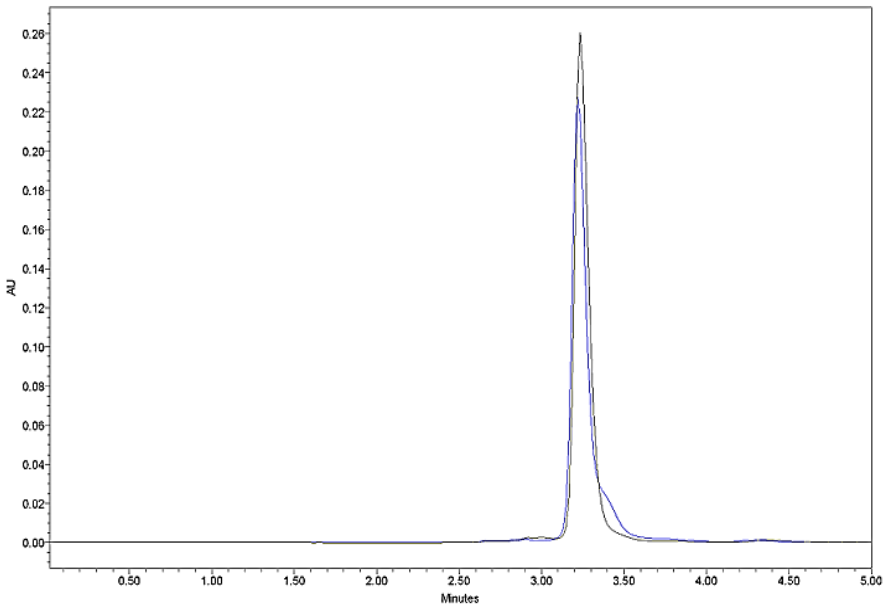

Figura 26. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na degradação ácida (HCl 0,01 M – 60 ºC) nos tempos 0 (em preto) e 8 horas (em azul) para vancomicina pó liofilizado pelo método cromatográfico proposto.

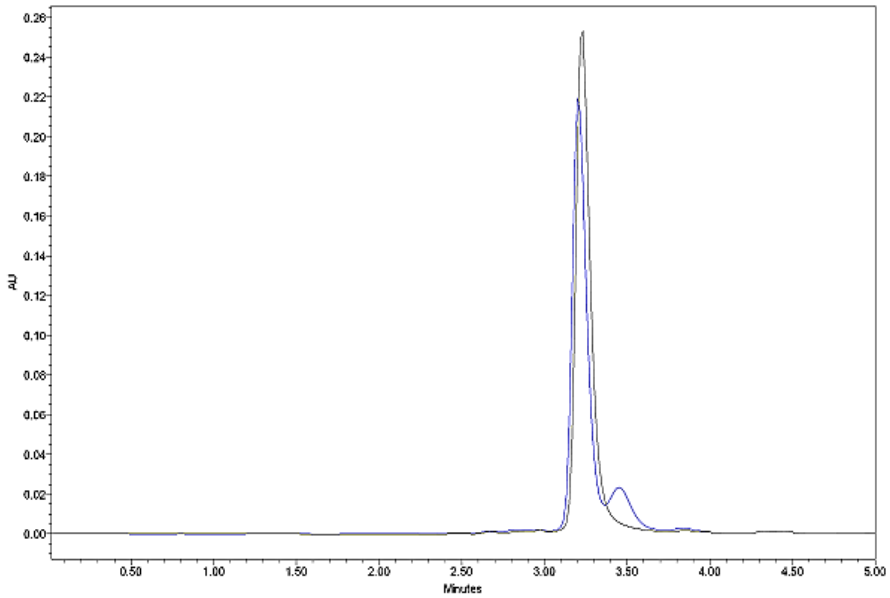

Figura 27. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na degradação alcalina (NaOH 0,01 M – 60 ºC) nos tempos 0 (em preto) e 8 horas (em azul) para vancomicina pó liofilizado pelo método cromatográfico proposto.

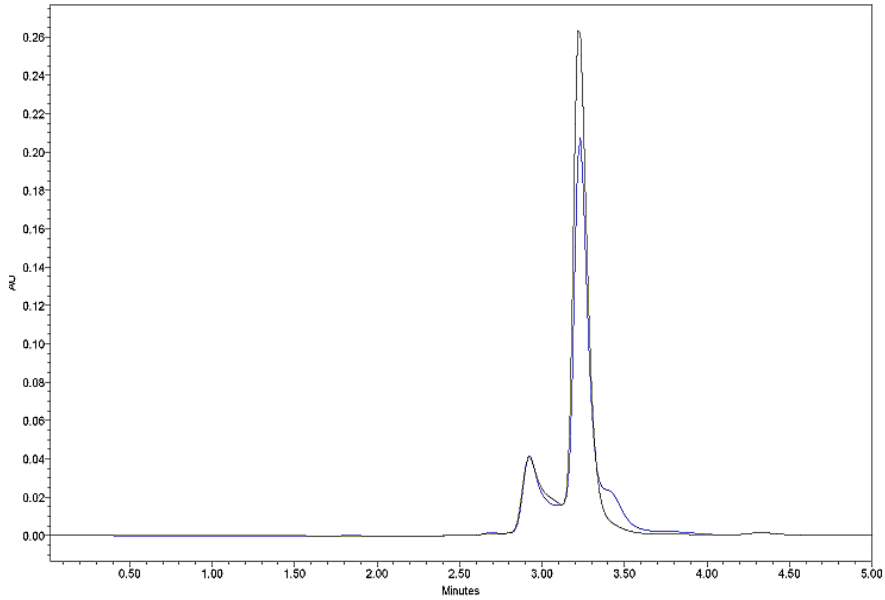

Figura 28. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na degradação oxidativa (H_2O_2 0,3 % – 60 ºC) nos tempos 0 (em preto) e 8 horas (em azul) para vancomicina pó liofilizado pelo método cromatográfico proposto.

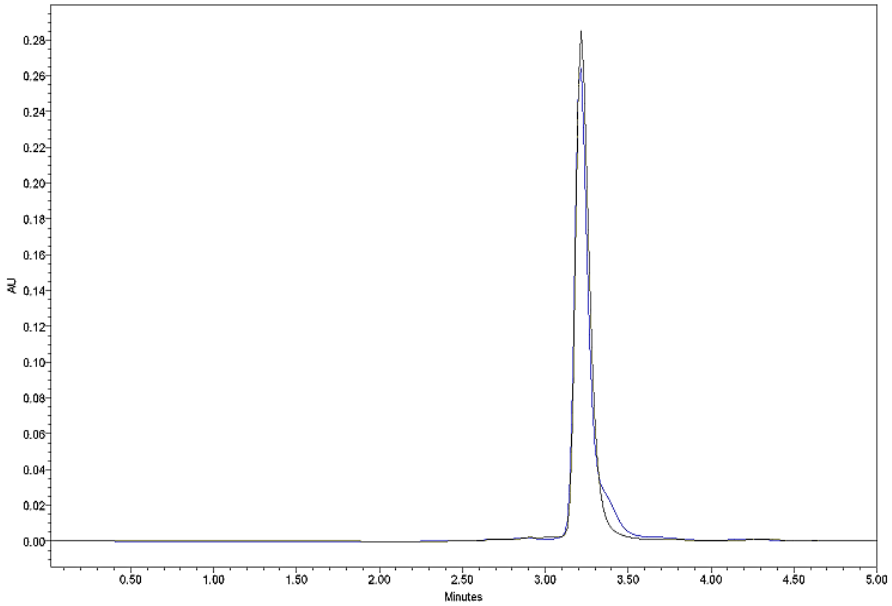

Figura 29. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na degradação neutra (água purificada – 60 ºC) nos tempos 0 (em preto) e 8 horas (em azul) para vancomicina pó liofilizado pelo método cromatográfico proposto.

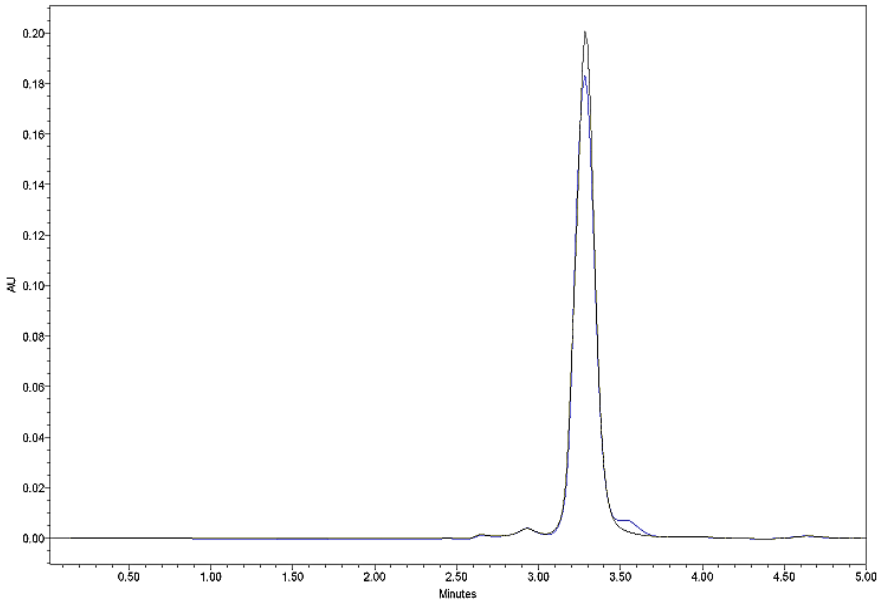

Figura 30. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na degradação fotolítica (Solução tamponante pH 6,8 – luz UV a 254 nm) nos tempos 0 (em preto) e 24 horas (em azul) para vancomicina pó liofilizado pelo método cromatográfico proposto.

Os valores de degradação obtidos para cada condição estão presentes na Tabela 29.

Tabela 29. Valores de degradação de vancomicina pó liofilizado pelo método cromatográfico proposto

Condição de degradação	Área no tempo 0	Área no tempo 8 h/24 h*	Porcentagem não degradada (%)	Porcentagem de degradação (%)
Ácida (HCl 0,1 M – 60 ºC)	1719124	1633578	95,02	4,98
Básica (NaOH 0,01 M – 60 ºC	1637732	1353215	82,63	17,37
Oxidativa (H_2O_2 0,3 % - 60 ºC	1754935	1547520	88,18	11,82
Neutra (água – 60 ºC)	1738662	1670038	96,05	3,95
Fotolítica (UV a 254 nm)	1705382	1645785	96,51	3,49

*Tempo 24 horas apenas para degradação fotolítica

6.5.4.1.Linearidade

A curva analítica foi construída com concentrações de 3 a 200 µg/mL e a partir desta curva foram escolhidas seis concentrações avaliar a linearidade, já que para este parâmetro deve-se tomar, no mínimo, cinco pontos da curva analítica. Os pontos escolhidos foram 40, 60, 80, 100, 120 e 140 µg/mL e três curvas analíticas foram construídas em triplicata e em três dias diferentes. A equação da reta y= 8336x + 5336 foi obtida pela regressão linear com coeficiente de determinação de 0,9996 e decorrelação (r) igual a 0,9998. A Figura 31 apresenta a curva analítica obtida.

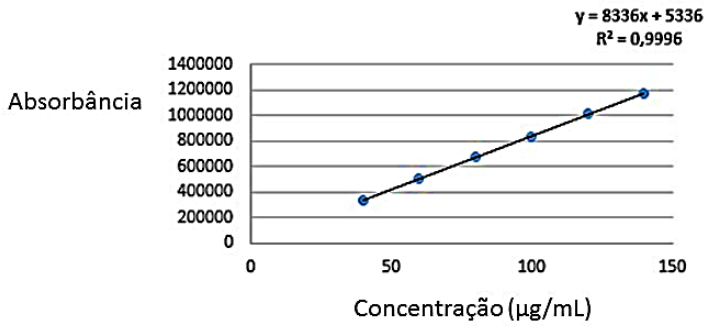

Figura 31. Curva analítica para vancomicina referência nas concentrações de 40, 60, 80, 100, 120 e 140 µg/mL, obtida pelo método cromatográfico a 280 nm.

A ANOVA, assim como o gráfico de dispersão de resíduos também foram realizados e encontram-se na Tabela 30 e na Figura 32, respectivamente.

Tabela 30. ANOVA obtida para os valores de área determinados nas curvas analíticas para vancomicina referência, para o método cromatográfico proposto

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	Fcalc.	Ftab.
Entre	5	1459879615592,45	291975923118,49	169,85*	3,11
Regressão linear	1	1458618004998,64	1458618004998,64	848,54*	4,75
Desvio de linearidade	4	1261610593, 80	315402648,45	0,18	3,26
Resíduo	12	1718982144,00	143248512,00	-	-

Total	17	1461598597736, 45	-	-	-

*Valores significativos para p<0,05

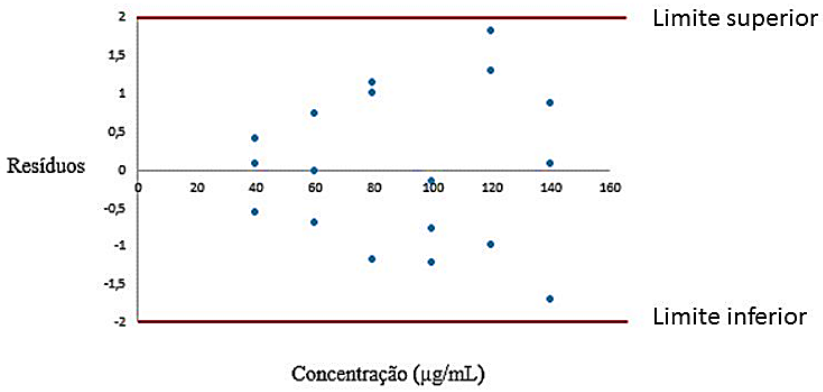

Figura 32. Gráfico de dispersão dos resíduos para vancomicina pelo método cromatográfico proposto.

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

Os limites de detecção e de quantificação obtidos a partir de três equações da reta foram, respectivamente, 2,067 µg/mL e 6,264 µg/mL.

6.5.4.3.Precisão

A precisão por repetibilidade e a intermediária foram analisadas por meio do DPR (%) e Teste F e Teste t. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 31.

Tabela 31. Valores de precisão intradia, interdias e intermediária, ANOVA e teste F e Teste t para vancomicina usando o método cromatográfico proposto

280 nm	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**DPR (%)**
Precisão intradia	828529	832045	819363	842079	823064	818451	1,08
Precisão interdias	854579	819701	838804	830009	820757	832848	0,47
Precisão intermediária	863576	867590	860348	841711	855748	859276	2,35
	ANOVA		**Test F**		**Test t**		
	Fcrít: 4,38		Fcrit: 5,05		Tcrit: 2,23		

	Fcal: 0,83	Fcal: 2,08	Tcal: -3,94

6.5.4.4.Exatidão

A exatidão foi realizada pelo método de recuperação de padrão e os resultados obtidos para os três dias de análise encontram-se na Tabela 32.

Tabela 32. Recuperação obtida para vancomicina usando método cromatográfico proposto

	Vancomicina SQR adicionada (µg/mL)	**Vancomicina SQR recuperada (µg/mL)**	**Recuperação (%)**	**Recuperação média (%)**	**DPR (%)**
R1	40	40,11	100,29		
R2	60	60,11	100,18	100,19	1,10
R3	80	80,07	100,09		

6.5.4.5.Robustez

Os resultados da robustez obtida pelo método de Youden & Steiner (1975) estão presentes na Tabela 33.

Tabela 33. Resultados obtidos na robustez para vancomicina usando método cromatográfico proposto

Parâmetro	**Efeito**	**Desvio padrão global**	**DPR x raiz de 2**
A	-0,18		
B	-1,42		
C	1,96		
D	-0,30	**10,66**	**15,08**
E	1,49		
F	-19,68		
G	1,62		

Parâmetros alterados: A: Comprimento de onda (nm); B: Concentração de ácido na fase móvel (%); C: Marca do etanol; D: Proporção de fase móvel; E: Tempo de ultrassom (min); F: Vazão (mL/min); G: Fonte de água.

Condição normal: Fase móvel: água + 0,1 % ácido acético: etanol (85:15, v/v) com vazão de 0,5 mL/min.

6.5.4.6.Doseamento

Foi realizado também o doseamento para vancomicina pó liofilizado para solução injetável em triplicata e em três dias diferentes. Os teores obtidos estão presentes na Tabela 34.

Tabela 34. Doseamento para vancomicina pó liofilizado usando o método cromatográfico proposto

Dia	Teor médio (%)	Teor final (%)	DPR (%)
1	97,48		
2	94,66	**96,06**	**1,47**
3	96,04		

6.5.5. Discussão

A CLAE é uma técnica caracterizada pela separação, identificação e quantificação de substâncias presentes em uma mistura (THAMMANA, 2016). É uma técnica aplicada para quase todas as substâncias existentes e apresenta alta precisão, o que a faz ser amplamente utilizada em diversos setores (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; KOGAWA; SALGADO, 2012; FIGUEIREDO; KOGAWA; SALGADO, 2017; LIMA; KOGAWA; SALGADO, 2018; KOGAWA; SALGADO, 2018).

A seletividade do método foi comprovada a partir da sobreposição dos cromatogramas de vancomicina referência e pó liofilizado. Ainda, os resultados da degradação forçada realizadas nas condições ácida, alcalina, oxidativa, neutra e fotolítica apresentaram pequena degradação do fármaco no período avaliado, sem interferência de produtos de degradação com o pico principal. Portanto, o método é considerado seletivo (KOGAWA; SALGADO, 2012; NASCIMENTO; KOGAWA; SALGADO, 2018).

Foram realizados testes nas concentrações de 3 a 200 µg/mL, de onde seis concentrações foram escolhidas (40 a 140 µg/mL) para compor a curva analítica.

A linearidade foi determinada por meio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados a partir da construção de três curvas analíticas obtendo-se a equação da reta y= 8336x + 5336 e coeficiente de determinação de 0,9996 e decorrelação (r) igual a 0,9998, estando de

acordo com o especificado na RDC 166 (2017). A ANOVA indica que há regressão linear significativa e não há desvio de linearidade significativo ($p<0,05$).

Os limites de detecção e de quantificação foram, respectivamente, 2,067 e 6,264 µg/mL, sendo valores de concentração baixos e, portanto, o método pode ser considerado sensível.

A precisão foi avaliada pela repetibilidade intradia pelo DPR 1,08 % que se mostrou adequado, estando abaixo de 2% (AOAC, 2002) e interdias através da ANOVA, obtendo-se Fcal.menor que Fcrít. (Fcal.= 0,83; Fcrít.= 4,39) e DPR (%) igual a 0,47. A precisão intermediária, com DPR (%) de 2,35 foi analisada através do teste F e teste t, onde o tcal. foi menor que o valor de tcrit. (tcal.= -3,94; tcrit = 2,23). Desta forma, conclui-se que o método é preciso.

A exatidão realizada pelo método de recuperação de padrão mostrou estar de acordo com os limites especificados de 98 a 102% (AOAC, 2002) com teor médio de 100,19%, conferindo exatidão ao método.

A robustez determinada pelo método de Youden & Steiner (1975) demonstrou que apenas um dos parâmetros alterados (vazão) apresentou efeito superior ao valor de referência, lendo-se os resultados em módulo. Desta forma, o método é considerado robusto frente as alterações realizadas nos parâmetros escolhidos, com exceção do parâmetro vazão.

Ainda, o doseamento realizado para vancomicina pó liofilizado apresentou teor de 96,06% conforme o especificado em sua monografia de 90 a 110% (JP, 2011).

Os resultados obtidos para todos os parâmetros da validação apresentaram-se de acordo com o estabelecido pela AOAC (2002) e RDC 166 (2017), o que torna o método cromatográfico proposto validado e adequado para a quantificação de vancomicina pó liofilizado para solução injetável.

6.6. Ensaio microbiológico

6.6.1. Material

Vancomicina SQR e pó liofilizado para solução injetável (descritos nos itens 4.1 e 4.2) foram submetidos à análise. O ensaio microbiológico pelo método turbidimétrico foi realizado utilizando *Brain Heart Infusion* (BHI) caldo Kasvi® (Paraná, Brasil) e *Trypticase Soy Agar* (TSA) para o cultivo dos microrganismos. A solução do fármaco foi preparada em água purificada Milli-Q® obtida de purificador Direct-Q® 3 Merck Millipore (Darmstadt, Alemanha), balança analítica Discovery Ohaus® (São Paulo, Brasil) modelo DV215CD e balança semi-

analítica Micronal® (São Paulo, Brasil) modelo B160. Os meios de cultura foram preparados conforme especificado no rótulo e esterilizados em autoclave Norte Científica® (Araraquara, Brasil) a 121 ºC e 1 atm por 15 minutos e para crescimento dos microrganismos, uma estufa Odontobrás (Brodowski, Brasil) modelo ECD Digital 1.2 foi utilizada. O ensaio foi realizado utilizando uma cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 6538.

Para o ensaio microbiológico, os microrganismos foram mantidos em uma incubadora orbital Shaker Marconi® (Piracicaba, Brasil) modelo MA420 e leituras foram realizadas em espectrofotômetro Quimis® (Diadema, Brasil) modelo Q-798 DRM.

6.6.2. Método

Os parâmetros analíticos seletividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez foram realizados de acordo com o especificado (AOAC, 2002; HORWITZ et al., 1980) e na RDC 166 (2017). Além disso, o doseamento foi obtido para confirmar se o teor do fármaco está de acordo com os limites especificados de 90 – 115 % (JP, 2011).

Foram pesados 0,00519 g de vancomicina SQR (equivalente a 5 mg de vancomicina) e transferidos para balão volumétrico de 25 mL com água purificada e submetido a banho ultrassônico por 5 minutos para completa solubilização do fármaco. Após este período o volume do balão volumétrico foi completado com o mesmo diluente, obtendo-se uma solução de 200 µg/mL. A partir desta solução estoque foram tomadas alíquotas para o preparo das soluções de trabalho. O mesmo procedimento foi realizado para vancomicina pó liofilizado, para o qual foram pesados 0,00505 g da amostra (equivalente a 5 mg de vancomicina) e transferidos para balão volumétrico de 25 mL e preenchido com água purificada. Após 5 minutos em banho ultrassônico, o volume do balão volumétrico foi completado com o mesmo diluente, obtendo-se solução de concentração igual a 200 µg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas nas mesmas concentrações que a substância de referência.

O preparo do meio de cultura (BHI) foi realizado de acordo com o especificado na embalagem e 10 mL foram distribuídos para cada tubo de ensaio e 30 mL para cada erlenmeyer onde o inóculo seria realizado. Todos os tubos e erlenmeyers contendo meio de cultura foram esterilizados em autoclave por 15 minutos à 121 ºC e 1 atm antes do uso.

Para a realização do ensaio foram pipetados 200 µL da solução de trabalho em cada tubo contendo os 10 mL de meio BHI e adicionaram-se alíquotas variadas de inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e 25923 padronizadas em 25 ± 2% de transmitância a 580 nm. Dois tubos a mais foram preparados correspondendo aos controles negativo (apenas meio

BHI) e positivo (meio BHI e inóculo). Todos os tubos contendo o meio, fármaco e inóculo foram mantidos em incubadora Shaker à 37 ºC e 32 rpm por 4 horas, após este período, 500 µL de solução de formaldeído a 12% foram adicionados em cada tubo, de forma a parar o crescimento bacteriano. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 530 nm, utilizando o meio de cultura adicionado 500 µL da solução de formaldeído 12% como branco, e os valores de absorbância obtidos para vancomicina SQR e pó liofilizado foram comparados de forma a obter a potência do fármaco. As condições testadas encontram-se descritas na Tabela 35.

Tabela 35. Condições testadas para desenvolvimento de método microbiológico turbidimétrico para vancomicina

Microrganismo	Concentração de fármaco (µg/mL)	Razão	Diluente	Volume de inóculo (µL)
S. aureus ATCC 6538	36, 54, 81	1,5	Solução tamponante pH 6,8	500
S. aureus ATCC 6538	16, 24, 36	1,5	Solução tamponante pH 6,8	500
S. aureus ATCC 6538	16, 24, 36	1,5	Solução tamponante pH 6,8	600
S. aureus ATCC 6538	25, 35, 49	1,4	Solução tamponante pH 6,8	600
S. aureus ATCC 6538	25, 35, 49	1,4	Água purificada	600
S. aureus ATCC 25923	25, 35, 49	1,4	Água purificada	600
S. aureus ATCC 25923	32, 40, 50	1,25	Água purificada	600
S. aureus ATCC 25923	30, 39, 50,7	1,3	Água purificada	600

6.6.3. Resultados e discussão

Com base nos valores de absorbância obtidos para cada concentração e, considerando os valores limites para absorvância de 0,2 a 0,8, de acordo com a lei de Lambert-Beer, a melhor condição testada foi escolhida e encontra-se descrita na tabela 36.

Tabela 36. Condições estabelecidas para o método turbidimétrico para vancomicina

Microorganismo	Concentrações (µg/mL)	Razão	Diluente	Volume de inóculo (µL)
S. aureus ATCC 25923	30, 39, 50,7	1,3	Água purificada	600

Os valores de absorbância obtidos para cada concentração de vancomicina referência e pó liofilizado encontram-se na Tabela 37, assim como a potência do fármaco obtida para ambos.

Tabela 37. Valores de absorvância e potência obtidos para vancomicina

Concentração do fármaco (µg/mL)	Vancomicina referência	Média	DPR (%)	Vancomicina pó liofilizado	Média	DPR (%)
30	0,693 0,772 0,683	0,716	6,81	0,790 0,711 0,740	0,747	5,35
39	0,595 0,583 0,539	0,572	5,15	0,640 0,638 0,595	0,624	4,07
50,7	0,428 0,383 0,385	0,399	6,38	0,410 0,420 0,530	0,453	14,69
			Potência 108,2			

De acordo com o especificado na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019), o intervalo de confiança para a potência calculada deve ser de no máximo ± 10 %, desta forma, os resultados obtidos podem ser considerados adequados e, devido aos valores de absorbância serem muito semelhantes, e DPR estar abaixo de 15 % (RDC 27/2012) pode-se confirmar a quantificação da vancomicina pelo método turbidimétrico proposto.

6.6.4. Validação

6.6.4.1.Seletividade e linearidade

Como a seletividade foi avaliada comparando os valores de absorvância obtidos para vancomicina SQR e pó liofilizado, a mesma foi obtida em conjunto com a linearidade.

Foram pesados 0,00519 g de vancomicina SQR e 0,00505 g de vancomicina pó liofilizado (equivalente à 5 mg de vancomicina) e transferidos para dois balões volumétricos de 25 mL contendo água purificada estéril. Ambos os balões foram mentidos em banho ultrassônico por 5 minutos e o volume foi então completado com o mesmo diluente, obtendo-se solução de concentração teórica de 200 µg/mL. A partir desta solução estoque, alíquotas foram tomadas para o preparo das soluções de trabalho nas concentrações de 30, 39 e 50,7 µg/mL e 200 µL destas soluções foram adicionadas aos tubos de ensaio contendo 10 mL de meio BHI e 600 µL de inóculo, e então mantidos em Shaker orbital por 4 horas. Após este período adicionou-se 500 µL da solução de formaldeído 12 % e procederam as leituras em 530 nm. A linearidade foi avaliada com base na equação da reta obtida na curva analítica e o coeficiente de correlação por meio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A ANOVA também foi realizada, assim como a construção do gráfico de dispersão de resíduos.

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

O limite de detecção foi determinado a partir das três curvas analíticas e aplicando-se a equação 1. O limite de quantificação foi determinado da mesma forma, mas utilizando-se a equação 2.

6.6.4.3.Precisão

A precisão foi determinada pelo método de repetibilidade e a precisão intermediária. Para o preparo das soluções foram pesados 0,00505 g de vancomicina pó liofilizado (equivalente à 5 mg de vancomicina) e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL adicionado de água purificada e submetido a banho ultrassônico por 5 minutos. O volume do balão foi completado com o mesmo diluente, obtendo-se solução de concentração igual a 200 µg/mL. Alíquotas de 0,975 µL foram tomadas da solução estoque e transferidas para balão volumétrico de 5 mL e completado com o mesmo diluente, obtendo-se a solução de trabalho na concentração de 39 µg/mL. Foram preparados seis tubos para vancomicina pó liofilizado na mesma concentração (39 µg/mL). A precisão intermediária foi realizada sob as mesmas condições, apenas alterando o analista e em dias diferentes. O DPR (%) foi avaliado e ANOVA

foi utilizada para a determinação da precisão interdias e Teste F e Teste t para precisão intermediária**.**

6.6.4.4.Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método de recuperação de padrão. Foram preparadas soluções de vancomicina SQR e pó liofilizado para solução injetável na concentração de 1000 µg/mL. A partir desta solução estoque foram tomadas alíquotas de 300 µL para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se assim soluções de vancomicina referência e pó liofilizado na concentração de 30 µg/mL cada. Para o preparo de R1, R2 e R3 (80,100 e 120 %) o mesmo volume de solução de vancomicina pó liofilizado foi adicionado (300 µL) alterando-se apenas os volumes de vancomicina referência, sendo R1= 12 µL, R2= 90 µL e R3= 168 µL. As concentrações utilizadas para obtenção da exatidão encontram-se na Tabela 38.

Tabela 38. Preparo das soluções de vancomicina para exatidão pelo método turbidimétrico proposto

	Vancomicina amostra (µg/mL)	**Vancomicna SQR (µg/mL)**	**Concentração final teórica (µg/mL)[a,b]**
Amostra	30	-	30
R1	30	1,2	31,2
R2	30	9,0	39
R3	30	16,8	46,8
Referência	-	30	30

[a]Diluída para balão volumétrico de 10 mL; [b]Cada nível foi preparado em triplicata

6.6.4.5.Robustez

A robustez do método foi determinada através de variações realizadas em três parâmetros considerados importante para o método são eles tempo de incubação, comprimento de onda de leitura e temperatura de incubação. A Tabela 39 apresenta os parâmetros escolhidos e as variações realizadas.

Tabela 39. Parâmetros alterados para robustez pelo método turbidimétrico proposto

Parâmetro	Condição normal	Condição alterada	
Tempo de incubação (min)	240	230	250
Comprimento de onda de leitura (nm)	530	528	532
Temperatura de incubação (ºC)	37	35	39

6.6.5. Resultados

6.6.5.1.Seletividade e linearidade

A curva analítica foi construída com concentrações de 30, 39 e 50,7 µg/mL e três curvas analíticas foram construídas em triplicata e em três dias diferentes. A equação da reta de vancomicina referência foi de y= -0,737ln(x) + 3,3259 foi obtida pela regressão linear com coeficiente de determinação de 0,9962 e decorrelação (r) igual a 0,9981 e para vancomicina pó liofilizado foi dey= -0,744ln(x) + 3,3383, com coeficiente de determinação igual a 0,9998 e de correlação (r) igual a 0,9999. A Figura 33 apresenta a curva analítica obtida.

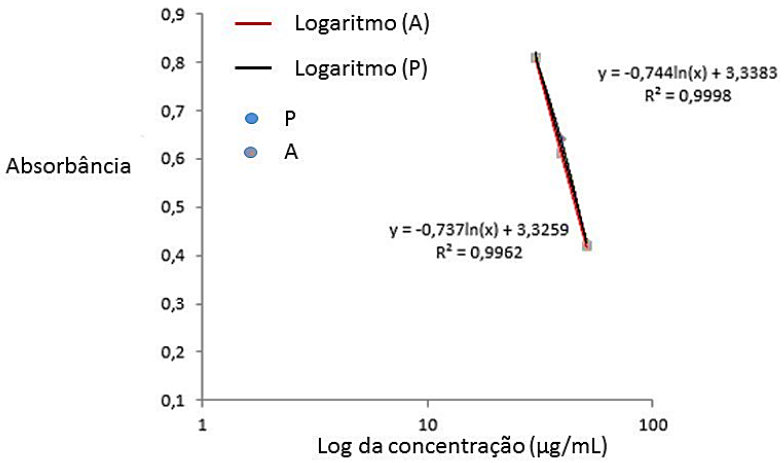

Figura 33. Curva analítica para vancomicina referência e pó liofilizado nas concentrações de 30, 39 e 50,7 µg/mL, obtida pelo método turbidimétrico proposto.

A ANOVA calculada para os dados obtidos das curvas analíticas de vancomicina é mostrada na Tabela40 e o gráfico de resíduos está representado na Figura 34.

Tabela 40. ANOVA obtida para os valores de absorvância determinados nas curvas analíticas para vancomicina referência, para o método turbidimétrico proposto

Fontes de variação		GL	SQ	QM	Fcal	Fcrit
	Preparação	1	0,00077	0,00077	0,420	4,96
	Regressão	1	0,45278	0,45278	246,280*	4,96
	Paralelismo	1	0,00001	0,00001	0,005	4,96
	Quadrático	1	0,00027	0,00027	0,148	4,96
	Diferença de quadrático	1	0,00062	0,00062	0,335	4,96
Desvio de linearidade	**Tratamentos**	5	0,45447	0,09089	49,438*	3,33
	Blocos	2	0,01039	0,00519	2,825	4,10
	Dentro (erro)	10	0,01838	0,00184		
	Total	17	0,48324	-		

*: Significativo para $p < 0,05$

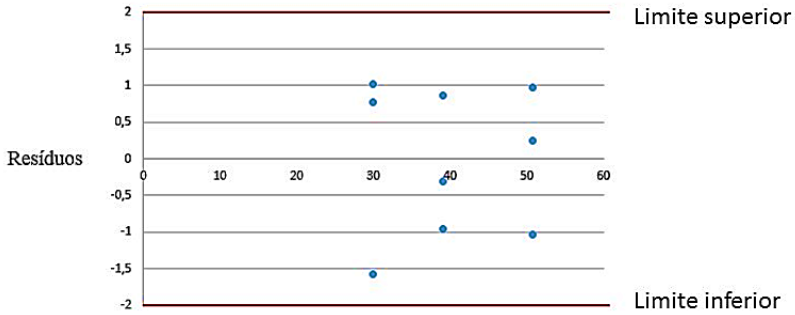

Figura 34. Gráfico de dispersão dos resíduos para vancomicina referência pelo método turbidimétrico proposto.

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

Os limites de detecção e de quantificação obtidos a partir de três equações da reta foram, respectivamente, 2,027 µg/mL e 6,293 µg/mL.

6.6.5.3.Precisão

A precisão por repetibilidade e a intermediária foram analisadas por meio do DPR (%) e Teste F e Teste t. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 41.

Tabela 41. Valores de precisão intradia, interdias e intermediária, ANOVA e teste F e Teste t para vancomicina usando o método turbidimétrico proposto

280 nm	1	2	3	4	5	6	DPR (%)
Precisão intradia	0,595	0,644	0,684	0,640	0,638	0,647	4,42
Precisão interdias	0,685	0,620	0,522	0,523	0,647	0,662	3,56
Precisão intermediária	0,668	0,625	0,697	0,655	0,636	0,679	2,03
	ANOVA		**Test F**		**Test t**		
	Fcrít: 4,38		Fcrit: 5,05		Tcrit: 2,23		
	Fcal: 0,37		Fcal: 1,11		Tcal: -1,17		

6.6.5.4.Exatidão

A exatidão foi realizada pelo método de recuperação de padrão e os resultados obtidos para os três dias de análise encontram-se na Tabela 42.

Tabela 42. Recuperação obtida para vancomicina usando método turbidimétrico proposto

	Vancomicina referência adicionada (µg/mL)	Vancomicina referência recuperada (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
R1	1,2	1,216	101,36		
R2	9,0	9,047	100,53	100,71	0,95
R3	16,8	16,84	100,24		

6.6.5.5.Robustez

Os resultados da robustez obtida variando três parâmetros considerados importantes para o método estão presentes na Tabela 43.

Tabela 43. Resultados obtidos na robustez para vancomicina usando método cromatográfico proposto

Parâmetro		1	2	3	Fcrit	Fcal	Tcrit	Tcal
Tempo de incubação	**230**	0,655	0,640	0,654	19	7,20	2,77	0,91
(min)	**250**	0,732	0,754	0,762	19	2,10	2,77	-5,51
Comprimento de onda	**528**	0,680	0,695	0,655	19	1,24	2,77	-0,82
de leitura (nm)	**532**	0,684	0,659	0,703	19	1,04	2,77	-1,08
Temperatura de	**35**	0,753	0,655	0,730	19	2,73	2,77	2,63
incubação (ºC)	**39**	0,687	0,759	0,739	19	5,19	2,77	1,55

6.6.5.6. Potência

Foi realizado também a determinação da potência para vancomicina pó liofilizado para solução injetável em triplicata e em três dias diferentes. Os teores obtidos estão presentes na Tabela 44.

Tabela 44. Determinação da potência para vancomicina pó liofilizado usando o método turbidimétrico proposto

Dia	Teor médio (%)	Teor final (%)	DPR (%)
1	108,20		
2	103,81	**103,32**	**4,97**
3	97,96		

6.6.6. Discussão

O método turbidimétrico se baseia na determinação do teor de antimicrobianos através da medida de turbidez (absorbância) que irá ser inversamente proporcional à concentração do fármaco, ou seja, com o aumento da concentração há a redução da turbidez, devido à inibição do crescimento microbiano. Este método foi, inicialmente, descrito em 1942 para quantificar penicilina em caldo nutriente (FOSTER, 1942). Além de ser um método fácil e rápido, faz-se necessário a aplicação de um método microbiológico para a determinação real do teor de vancomicina (KOGAWA; SALGADO, 2012; SILVA; SALGADO, 2015; TÓTOLI; SALGADO, 2015; KOGAWA; SALGADO, 2016; PEDROSO; KOGAWA; SALGADO, 2018)

A seletividade do método foi comprovada em conjunto com a linearidade, a partir da comparação dos valores de absorbância obtidos para vancomicina SQR e amostra. Foram

realizadasleituras nas concentrações de 30, 39 e 50,7 µg/mL, para vancomicina referência e amostra e, obteve-se então, a curva analítica.

A linearidade foi determinada por meio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados a partir da construção de três curvas analíticas obtendo-se a equação da reta $y= -0,737\ln(x) + 3,3259$ para vancomicina SQR e $y= -0,744\ln(x) + 3,3383$ para amostra e coeficiente de correlação (r) igual a 0,9981 e 0,9999, respectivamente, estando de acordo com o especificado na RDC 166 (2017). A ANOVA indica que há regressão linear significativa e não há desvio de linearidade significativo ($p<0,05$).

Os limites de detecção e de quantificação foram, respectivamente, 2,027 µg/mL e 6,293 µg/mL, sendo valores de concentração baixos e, portanto, o método pode ser considerado sensível.

A precisão foi avaliada pela repetibilidade intradia pelo DPR 4,42 % que se mostrou adequado, estando abaixo de 15 % (RDC 166, 2017) e interdias através da ANOVA, obtendo-se Fcal. menor que Fcrít. (Fcal. = 0,37; Fcrít. = 4,39) e DPR (%) igual a 3,56. A precisão intermediária, com DPR (%) de 2,03 foi analisada através do teste F e teste t, onde o tcal. foi menor que o valor de tcrit. (tcal. = 1,64; tcrit = 2,23). Desta forma, conclui-se que o método é preciso.

A exatidão realizada pelo método de recuperação de padrão mostrou estar de acordo com os limites especificados de 98 a 102 % (AOAC, 2002) com teor médio de 100,71 %, conferindo exatidão ao método.

A robustez determinada pelavariação do tempo de incubação, comprimento de onda de leitura e temperatura de incubação foi avaliada pelo Test F e Teste t, em que os valores de Tcal. foram menores que os valores de Tcrit.,com exceção da variação do tempo de incubação para cima, ou seja, aumentando-se o tempo de incubação os resultados obtidos são estatisticamente diferentes, demonstrandoque o método é considerado robusto frente as alterações realizadas nos parâmetros escolhidos, com exceção do parâmetro tempo de incubação.

Ainda, o doseamento realizado para vancomicina pó liofilizado apresentou teor de 103,32 % conforme o especificado em sua monografia de 90 a 110 % (JP, 2011).

Os resultados obtidos para todos os parâmetros da validação apresentaram-se de acordo com o estabelecido pela AOAC (2002) e RDC 166 (2017), o que torna o método turbidimétrico proposto validado e adequado para a quantificação de vancomicina pó liofilizado para solução injetável.

7. ANÁLISE COMPARATIVA

A análise comparativa é uma importante ferramenta para determinar se a variabilidade dos métodos ocorre de forma significativa, e se os mesmos podem ser intercambiáveis entre si. De acordo com a Farmacopeia dos Estados Unidos da América (USP 39, 2016) é recomendada a avaliação dos parâmetros de precisão e exatidão para provar a equivalência entre os métodos. A Tabela 45 apresenta os parâmetros determinados para os métodos quantitativos de espectrofotometria na região do UV, IV, CLAE e método turbidimétrico validados.

Tabela 45. Aplicabilidade, precisão e exatidão dos métodos de espectrofotometria na região do UV, IV, HPLC e turbidimétrico validados

Parâmetros	**Métodos**			
	UV[a]	**IV[b]**	**CLAE**	**TURBI[c]**
Faixa de leitura	280 nm	1450 – 1375 1/cm	280 nm	530 nm
Faixa de concentração	50 – 150 µg/mL	1,0 – 2,0 mg/150 mg	40 – 140 µg/mL	30, 39 e 50,7 µg/mL
Equação: y = ax + b				
a	0,0044	0,3857	8345,9	R: - 0,737 A: - 0,744
b	0,0018	- 0,0011	4343,6	R: 3,3259 A: 3,3383
r	0,9997	0,9994	0,9999	R: 0,9981 A: 0,9999
Precisão intradias (DPR %)	1,90	2,29	1,08	4,42
Precisão interdias (DPR %)	0,88	1,69	0,47	3,56
Exatidão (%)	101,10	99,37	100,19	100,71

a: Espectrofotometria na região do UV; ***b:*** Espectrofotometria na região do IV; ***c:*** Método turbidimétrico; R: vancomicina SQR; A: vancomicina amostra.

Considerando a precisão dos métodos, todos apresentaram-se satisfatórios, com valores de DPR (%) menores que 5 %. Em relação à exatidão todos os métodos apresentaram valores

próximos de 100 %, obedecendo os limites estabelecidos e adotados neste trabalho de 98 a 102 % (AOAC, 2002).

A análise comparativa também pode ser realizada através do cálculo de ANOVA para o doseamento. Inicialmente foram comparados apenas os métodos físico – químicos validados neste trabalho, após, foi feita a comparação destes métodos com o microbiológico. A Tabela 46 apresenta os dados de doseamento obtidos para cada método.

Tabela 46. Valores obtidos na determinação do teor de vancomicina pó liofilizado utilizando os métodos de espectrofotometria na região do UV, IV, CLAE e turbidimétrico

Parâmetros	**Métodos**			
	UV[a]	**IV[b]**	**CLAE**	**TURBI[c]**
Teor (%)	94,56	101,66	97,48	108,20
	96,12	103,63	94,66	103,81
	96,26	101,75	96,04	97,96
Teor médio (%)	95,65	102,35	96,06	103,32
DPR (%)	0,99	1,09	1,47	4,97

a: Espectrofotometria na região do UV; ***b:*** Espectrofotometria na região do IV; ***c:*** Método turbidimétrico.

Os resultados do tratamento estatístico estão presentes na Tabela 47.

Tabela 47. ANOVA para o doseamento de vancomicina pó liofilizado pelos métodos de espectrofotometria na região do UV, IV e CLAE

Fontes de variação	**Graus de liberdade (GL)**	**Soma de quadrados (SQ)**	**Quadrado médio**	**F cal.**	***p***	**Ftab.**
Entre Grupos	2	0,08	0,04	0,002	0,75	5,14
Dentro dos grupos	6	92,73	15,45			
Total	8	92,81				

Com base nos resultados de ANOVA comparando os três métodos físico–químicos (espectrofotometria na região do UV, IV e CLAE) observa-se que o valor de Fcalculado é menor que o de Ftabelado, indicando que os métodos fornecem, estatisticamente, os mesmos resultados para a quantificação de vancomicina pó liofilizado. Sabendo disso, foi feita a

comparação entre os métodos físico – químicos e o microbiológico para verificar se também é possível obter os mesmos resultados. O cálculo de ANOVA para esta comparação encontra-se na Tabela 48.

Tabela 48. ANOVA para o doseamento de vancomicina pelos métodos físico–químicos e microbiológico

Fontes de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma de quadrados (SQ)	Quadrado médio	F cal.	*p*	Ftab.
Entre Grupos	2	12,49	6,25	0,289	0,76	4,26
Dentro dos grupos	9	196,44	21,83			
Total	11	208,93				

A ANOVA comparando tanto os métodos físico-químicos quanto o microbiológico apresentou valor de Fcalculado menor que Ftabelado, entretanto, foi realizada uma análise comparativa em pares de métodos por meio do test F e test t para confirmar se eles são iguais estatisticamente. Os resultados encontram-se na Tabela 49.

Tabela 49. Análise comparativa dos métodos em parespor teste F e teste t

	CLAE x UV	CLAE x IV	CLAE x Turbi	UV x IV	UV x Turbi	IV x Turbi
Fcal.	1,59	1,96	41,88	1,23	26,32	21,33
Fcrit.	19	19	19	19	19	19
Tcal.	0,049	8,58	2,58	7,79	2,55	0,32
Tcrit.	2,77	2,77	4,30	2,77	4,30	4,30

A análise comparativa realizada pelo test F e test t mostrou ser importante, pois evidenciou que há diferenças nos métodos analíticos validados. Apenas CLAE e o método espectrofotométrico na região do UV apresentaram ser intercambiáveis. Quando foram comparados os métodos CLAE e IV e UV e IVrejeitamos a hipótese de que as variâncias são iguais e assumimos que os dados variam de forma diferente, sendo, portanto, indicativo de que estes métodos não podem ser intercambiáveis.

A espectrofotometria na região do UV é uma técnica de simples execução e rápida, fornecendo resultados reprodutíveis, podendo ser aplicada à quantificação de fármacos (KOGAWA; SALGADO, 2016; PEDROSO; SALGADO, 2013; MORENO; SALGADO, 2009). A quantidade de solvente gasto na análise é reduzida e o preço destes solventes é acessível, tornando esta técnica mais barata. Neste trabalho foi desenvolvido um método para quantificação de vancomicina utilizando a espectrofotometria na região do UV, apresentando como principal característica, a redução do uso de solventes orgânicos. Além disso, a miniaturização do método permite uma redução ainda maior do uso de solventes e também do fármaco em análise. Entretanto, quando comparado a outras técnicas, como aCLAE, por exemplo, apresenta baixa especificidade, não permitindo a detecção de possível produtos de degradação ou impurezas que poderiam absorver no mesmo comprimento de onda.

Dentre os métodos desenvolvidos neste trabalho a espectrofotometria na região do IV é considerada a técnica mais ecológica, já que não é feito o uso de solventes, além do diluente utilizado (KBr) ser de custo acessível. Ainda, é uma técnica de simples execução e menor tempo de análise eos resultados fornecem elevada especificidade, entretanto, é necessário cuidado rigoroso com o controle da umidade do ambiente e temperatura, além de apresentar elevado custo de equipamento, sendo em torno de dez vezes maior que um espectrofotômetro UV-VIS.

A CLAE é atualmente uma das principais técnicas utilizadas, principalmente em indústrias farmacêuticas, devido à sua especificidade, permitindo a identificação de impurezas ou produtos de degradação, o que não é possível utilizando a espectrofotometria na região do UV e IV. Uma das desvantagens desta técnica é o uso de solventes orgânicos, na sua maioria tóxicos como acetonitrila e metanol, entretanto, neste trabalho foi desenvolvido um método por CLAE para vancomicina utilizando apenas água e etanol, com adição de pequena quantidade de ácido, apenas para diminuir a cauda do pico cromatográfico, sendo uma vantagem frente aos métodos presentes na literatura.

O desenvolvimento de métodos microbiológicos é muito importante para a determinação do teor de fármacos. Apesar de os métodos físico–químicos fornecerem resultados precisos e, alguns métodos serem sensíveis, apenas o método microbiológico é capaz de fornecer a potência real do antimicrobiano, por isso faz-se necessário o uso complementar de métodos físico–químicos com microbiológicos.

Sendo assim, na escolha de um método físico-químico para avaliação da vancomicina em pó liofilizado a CLAE ou o UV poderiam ser escolhidos dependendo do objetivo da analise pretendida e considerando a sensibilidade de cada técnica. Por se tratar de um antimicrobiano, concomitante a essa escolha e a essa análise é fundamental a avaliação microbiológica pelo

método turbidimétrico desenvolvido e validado neste trabalho, uma vez que ele mostrou-se intercambiável com os métodos de CLAE e UV também desenvolvidos e validados neste trabalho.

Uma outra opção seria a escolha da avaliação da vancomicina em pó liofilizado por IV e turbidimetria, contemplando as análises físico-quimica e microbiológica.

Vale ressaltar que essas escolhas dependem dos objetivos pretendidos em cada análise, das características envolvidas em cada técnica, bem como a consciência analítica do operador.

8. CONCLUSÕES

Existem inúmeros métodos analíticos para vancomicina em diferentes matrizes, incluindo o pó liofilizado, presentes na literatura, entretanto, nenhum destes métodos consegue compreender os princípios da Química Analítica Verde, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novos métodos, visando a redução da geração de resíduos tóxicos para o meio ambiente e para o operador, redução do tempo de análise e de custos.

A análise qualitativa de vancomicina foi realizada através de suas características físicas, peso médio, ponto de fusão, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região do UV e IV e CLAE.

O método de espectrofotometria na região do UV mostrou-se adequado para quantificar a vancomicina nas concentrações de 50 a 150 µg/mL utilizando solução tamponante fosfato de potássio pH 6,8 como diluente a 280 nm. A técnica é muito simples e de fácil execução, além disso, a sua miniaturização a torna mais ambientalmente correta devido à redução da quantidade de solventes utilizados. A partir desta técnica é possível estipular o parâmetro comprimento de onda a ser utilizado para CLAE.

O método de espectrofotometria na região do IV mostrou-se adequado para a quantificação de vancomicina através da banda de CH_3 dimetil na região de 1450 – 1375 1/cm. Esta técnica é considerada a mais verde dentre as demais realizadas neste trabalho devido a não utilização de solventes e reduzida geração de resíduos que não são tóxicos, ainda, é de fácil execução e os resultados são obtidos rapidamente.

O método desenvolvido por CLAE para a quantificação de vancomicina também se apresentou adequado nas concentrações de 40 a 140 µg/mL, utilizando fase móvel praticamente atóxica, contendo em sua maior quantidade água, o ácido acético adicionado não fornece toxicidade ao operador ou meio ambiente e o mesmo está em baixa concentração. O etanol é um dos solventes orgânicos menos tóxicos. Além disso, a vazão de 0,5 mL/min também favorece a redução do gasto de solventese na geração de resíduos. A coluna utilizada apresenta fase estacionária simples, portanto apresenta menor custo, e também seu tamanho é menor, 150 mm, quando comparada a uma de 250 mm, o que também reduz o gasto de solventes. Ainda, o tempo de análise também é menor, em torno de 5 minutos, possibilitando a realização de várias injeções em um mesmo dia de análise.

O método microbiológico desenvolvido utilizando a técnica de turbidimetria também se mostrou adequado para a determinação do teor de vancomicina nas concentrações

de 30, 39 e 50,7 µg/mL. Esta técnica faz-se necessária para determinar o teor real do fármaco, o que é possível apenas por técnica microbiológica. Em comparação aos métodos já existentes de difusão em ágar, a turbidimetria é considerada mais ecológica devido à simplicidade de realização da análise, mas, principalmente, devido aos resultados serem obtidos de forma rápida, possibilitando a realização de várias análises em um mesmo dia.

O estudo de degradação forçada realizada para os métodos de espectrofotometria na região do UV e CLAE indicaram certa estabilidade do fármaco frente às condições de estresse submetidas, apresentando pequena porcentagem de degradação no período de 8 horas para as condições ácida, alcalina, oxidativa e neutra, e para 24 horas, para o estresse fotolítico.

Este trabalho apresentou quatro métodos inovadores frente aos presentes na literatura, seguindo os princípios da Química Analítica Verde através da redução do tempo de análise e da geração de resíduos e, consequentemente dos custos, o uso de solventes menos tóxicos foi proposto e mostrou-se eficiente, sendo uma importante alternativa para os solventes orgânicos utilizados atualmente.

REFERÊNCIAS

AGUILERA-CORREA, J.J.; DOADRIO, A.L.; CONDE, A.; ARENAS, M.A.; DAMBORENEA, J.J.; VALLET-REGÍ, M.; ESTEBAN, J. Antibiotic release from F-doped nanotubular oxide layer on TI6AL4V alloy to decrease bacterial viability. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine,** v. 29, n. 118, p. 2-10, 2018.

ALESSIO, P. V.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Quality of ceftriaxone sodium in lyophilized powder for injection evaluated by clean, fast, and efficient spectrophotometric method. Journal of Analytical Methods in Chemistry, v. 2017, p. 1-4, 2017.AOAC – **Association of Official Analytical Chemists**. Official Methods of analysis. 17 ed. Gaithersburg: AOAC, 2002, v. 1.

ARMSTRONG, C.J.; WILSON, T.S. Systemic absorption of vancomycin. **Journal of clinical pathology**, v. 48, p. 689-692, 1995.

ARTHUR, M.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Glycopeptide resistance in enterococci. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 401-407, 1996.

ASHFORD, P.A.; BEW, S.P. Recent advances in the synthesis of new glycopeptide antibiotics**. Chemical Society Reviews**, v 41, p. 957-978, 2012.

BAILIE, G.R.; NEAL, D. Vancomycin Ototoxicity and Nephrotoxicity A Review. **Medical toxicology**, v. 3, p. 376-386, 1988.

BAMBEKE, F.V.; LAETHEM, Y.V.; COURVALIN, P.; TULKENS, P.M. Glycopeptide antibiotics from conventional molecules to ne derivatives**. Drugs**, v. 64, n. 9, p. 913-936, 2004.

BARCO, S.; CASTAGNOLA, E.; GENNAI, I.; BARBAGALLO, L.; LOY, A.; TRIPODI, G.; CANGEMI, G. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry vs. commercial immunoassay for determination of vancomycin plasma

concentration in children. Possible implications for everyday clinical practice. **Journal of Chemoterapy,** v. 28, n. 5, p. 395-402, 2016.

BEACH, J.E.; PERROTT, J.; TURGEON, R.D.; ENSOM, M.H.H. Penetration of Vancomycin into the Cerebrospinal Fluid: A Systematic Review**. Clinical Pharmacokinetics**, v. 56, n. 12, p. 1479-1490, 2017.

BERTI, A.D.; HUTSON, P.R.; SCHULZ, L.T.; WEBB, A.P.; ROSE, W.E. Compatibility of cefepime and vancomycin during simulated Y-site administration of prolonged infusion**. American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 72, p. 390-395, 2015.

BOZDAG, S.; WEYENBERG, W. ADRIAENS, E.; DHONDT, M.M.M.; VERGOTE, V.; VERVAET, C.; DE PRIJICK, K.; NELIS, H.J.; DE SPIEGELEER, B.; LUDWIG, A.; REMON, J.P. In vitro evaluation of gentamicin- and vancomycin containing minitablets as a replacement for fortified eye drops**. Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, p. 1259-1270, 2010.

BRASIL. **Ministério da Saúde. RDC nº27**, de 17 de maio de 2012, que Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, DF, 17 de maio de 2012.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Resolução RE nº 166**, de 24 de julho de 2017, que Dispõe sobre Validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, DF, 25 de julho de 2017.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).** Lista de Medicamentos Similares e seus respectivos medicamentos de referência**,** conforme RDC 58/2014.Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Lista%2Bsite%2B26-

0116%2BEXCEL.pdf/b5e6d58d-5315-4a73-b1ed-25e289d1e2f5.Acesso em 03 de abril de 2019.

BRBAKLIC, V.; KOGAWA, A. C.; NUNES SALGADO, H. R. Quantification of Rifaximin in Tablets by an Environmentally Friendly Visible Spectrophotometric Method. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 13, p. 532-537, 2017.

BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationery Office, 2012.

CAO, M.; FENG, Y.; ZHANG, Y.; KANG, W.; LIAN, K.; AI, L. Studies on the metabolism and degradation of vancomycin in simulated *in vitro* and aquatic environment by UHPLC-Triple-TOF-MS/MS. **Nature**, v. 8, p. 1-13, 2018.

CHAE, J.J.; MULREANY, D.G.; GUO, Q.; LU, Q.; CHOI, J.S.; STREHIN, I.; ESPINOZA, F.A.; SCHEIN, O.; TREXLER, M.M.; BOWER, K.S.; ELISSEEFF, J.H. Application of a collagen-based membrane and chondroitin sulfate-based hydrogel adhesive for the potential repair of severe ocular surface injuries. **Military Medicine**, v. 179, p. 686-694, 2014.

CHAKRABORTI, M.; JACKSON, J.K.; PLACKETT, D.; GILCHRIST, S.E.; BURT, H.M. The application of layered double hydroxide clay (LDH)- poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) film composites for the controlled release of antibiotics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine,** v. 23, p. 1705-1713, 2012.

CHANG, Y.; CHEN, W.C.; HSIEH, P.H.; CHEN, D.W.; LEE, M.S.; SHIH, H.N.; UENG, S.W.N. *In vitro* activities of daptomycin-, vancomycin-, and teicoplanin-loaded polymethylmethacrylate against methicillin-susceptible, methicillin-resistant, and vancomycin-intermediate strains of *Staphylococcus aureus.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p. 5480-5484, 2011.

CHEN, D.W.; HSU, Y.H.; LIAO, J.Y.; LIU, S.J.; CHEN, J.K.; UENG, S.W.N. Sustainable release of vancomycin, gentamicin and lidocaine from novel electrospun sandwich-

structured PLGA/collagen nanofibrous membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, p. 335-341, 2012.

CHEN, F.; HU, Z.Y.; LAIZURE; S.C.; HUDSON, J.Q. Simultaneous assay of multiple antibiotics in human plasma by LC–MS/MS: importance of optimizing formic acid concentration. **Bioanalysis**, v. 9, n. 5, p. 469-483, 2017.

CHÉDRU-LEGROS, V.; FINES-GUYON, M.; CHÉREL, A.; PERDRIEL, A.; ALBESSARD, F.; DEBRUYNE, D.;MOURIAUX, F. In vitro stability of fortified ophthalmic antibiotics stored at 220 ºC for 6 months. **Cornea**, v. 29, p. 807-811, 2010.

CHOU, Y.C.; CHEN, Y.S.; HSU, Y.H.; YU, Y.H.; LIU, S.J. A bio-artificial poly([d,l]-lactide-co-glycolide) drug-eluting nanofibrous periosteum for segmental long bone open fractures with significant periosteal stripping injuries**. International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 941-953, 2016.

COMETA, S.; MATTIOLI-BELMONTE, M.; CAFAGNA, D.; IATTA, R.; CECI, E.; DE GIGLIO, E. Antibiotic-modified hydrogel coatings on titanium dental implants**. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 26, p. 65-71, 2012.

CUI, L.; MURAKAMI, H.; KUWAHARA-ARAI, K.; HANAKI, H.; HIRAMATSU, K. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by Staphylococcus aureus Mu50. **Antimicrobial agents chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2276-2285, 2000.

DE MARCO, B.A.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of an innovative method for the determination of cefadroxil monohydrate in capsules. **Physical Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 67-74, 2016.

ELKHODAIRY, K.A.; AFIFI, S.A.; ZAKARIA, A.S. A promising approach to provide appropriate colon target drug delivery systems of vancomycin HCl: pharmaceutical and microbiological studies. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-14, 2014.

EP. EUROPEAN Pharmacopoeia. 7th ed. Council of Europe, 2011.

FARMACOPEIA Brasileira. 6. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

FIGUEIREDO, A. L.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of an ecological, new and rapid stability-indicating High Performance Liquid Chromatographic method for quantitative determination of aztreonam in lyophilized powder for injection. **Drug Analytical Research**, v. 1, p. 24-30, 2017.

FOOKS, J.R.; MCGILVERAY, I.J.; STRICKLAND, R.D. Colorimetric assay and improved method for identification of vancomycin hydrochloride**. Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 57, p. 314-317, 1968.

FOSTER, J.W. Quantitative estimation of penicillin**. Journal of Biological Chemistry**, v. 144, p. 285-286, 1942.

FRANCISCO, F.L.; SAVIANO, A.M.; ALMEIDA, T.S.B.; LOURENÇO, F.R. Kinetic microplate bioassays for relative potency of antibiotics improved by partial Least Square (PLS) regression. **Journal of Microbiology Methods**, v. 124, p. 28-34, 2016.

FREW, N.M.; CANNON, T.; NICHOL, T.; SMITH, T.J.; STOCKLEY, I. Comparison of the elution properties of commercially available gentamicin and bone cement containing vancomycin with ‘homemade’ preparations. **The Bone and Joint Journal**, v. 99-B, n. 1, p. 73-77, 2017.

GÁLVEZ-LÓPEZ, R.; PEÑA-MONJE, A.; ANTELO-LORENZO, R.; GUARDIA-OLMEDO, J.; MOLIZ, J.; HERNÁNDEZ-QUERO, J.; PARRA-RUIZ, J. Elution kinetics, antimicrobial activity, and mechanical properties of 11 different antibiotic loaded acrylic bone cement. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 78, p. 70-74, 2014.

GESSMANN, J.; SEYBOLD, D.; AYAMI, F.; PETER, E.; BEACKER, H.; SCHILDHAUER, T.A.; KÖLLER, M. Peripheral blood plasma clot as a local antimicrobial drug delivery matrix. **Tissue Engineering Part A**, v. 24, p. 809-818, 2018.

GUMP, D.W. Vancomycin for treatment of bacterial meningitis**. Reviews of Infectious diseases**, v. 3, p. 289-292, 1981.

HADWIGER, M.E.; SOMMERS, C.D.; MANS, D.J. PATEL, V.; BOYNE II, M.T. Quality assessment of U.S. marketplace vancomycin for injection products using High-Resolution Liquid Chromatography-Mass spectrometry and potency assays. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 2824-2830, 2012.

HAMILTON-MILLER, J.M. Glycopeptide-resistant staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, nº1, p. 63-65, 1999.

HORWITZ, W.; KAMPS, L.R.; BOYER, K.W.J. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **Association of Official Analytical Chemists**, v. 63, p. 1344-1355, 1980.

HSU, Y.H.; CHEN, D.W.C.; TAI, C.D.; CHOU, Y.C.; LIU, S.J.; UENG, S.W.N.; CHAN, E.C. Biodegradable drug-eluting nanofiber-enveloped implants for sustained release of high bactericidal concentrations of vancomycin and ceftazidime: in vitro and in vivo studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 4347-4355, 2014.

HSU, Y.H.; LIN, C.T.; YU, Y.H.; CHOU, Y.C.; LIU, S.J.; CHAN, E.C. Dual delivery of active antibactericidal agents and bone morphogenetic protein at sustainable high concentrations using biodegradable sheath-core-structured drug-eluting nanofibers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 3927-3937, 2016.

HYATT, A.J.T.; RAJAN, M.S.; BURLING, K.; ELLINGTON, M.J.; TASSONI, A.; MARTIN, K.R. Release of vancomycin and gentamicin from a contact lens versus a fibrin coating applied to a contact lens**. Cornea**, v. 53, p. 1946-1952, 2012.

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

JAVORSKA, L.; KRCMOVA, L.K.; SOLIC, P.; KASKA, M. Simple and rapid quantification of vancomycin in serum, urine and peritoneal/pleural effusion via UHPLC-MS/MS applicable to personalized antibiotic dosing research**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 142, p. 59-65, 2017.

JP. JAPANESE Pharmacopoeia. 16th ed. Tokyo Society of Japanese Pharmacopoeia, 2011. p.557-560.

JONES, R.N. Microbiological features of vancomycin in the 21st century: Minimun inhibitory concentration creep, bactericidal/static activity and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect resistant strains. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 13-24, 2006.

JOSHI, M.D.; O'DONNELL, J.N.; VENKATESAN, N.; CHANG, J.; NGUYEN, H.; RHODES, N.J.; PAIS, G.; CHAPMAN, R.L.; GRIFFIN, B.; SCHEETZ, M.H. High-Performance Liquid Chromatography method for rich pharmacokinetic sampling schemes in translational rat toxicity models with vancomycin. **Clinical and Translational Science**, v. 10, p. 496-502, 2017.

KAHNE, D.; LEIMKUHLER, C.; LU, W.; WALSH, C. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 425-448, 2005.

KANG, H.K.; YOONKYUNG, P. Glycopeptide Antibiotics: Structure and mechanisms of action**. Journal of Bacteriology and Virology**, v. 45, n. 2, p. 67-78, 2015.

KIRK, L.; LEWIS, P.; LUU,Y.; BROWN, S. Stability of commercially available grape and compounded cherry oral vancomycin preparations stored in syringes and cups. **International Journal of Pharmaceutical Compouding**, v. 20, n. 2, p. 159-163, 2016.

KOGAWA, A. C.; TOMITA, L. K.; SALGADO, H. R. N. Development and validation of a stability-indicative turbidimetric assay to determine the potency of doxycycline hyclate in tablets. **International Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 316-321, 2012.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of infrared spectroscopy method for the determination of darunavir in tablets. **Physical Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2013.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Quantification of doxycycline hyclate in tablets by HPLC–UV method**. Journal of Chromatographic Science**, v. 2013, nº 51, p. 919-925, 2013.

KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Optimization of microbiological method by turbidimetry for quantification of rifaximin tablets: validation, application and evaluation of degraded compounds. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 7, p. 518, 2016.

KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Quantification of rifaximin in tablets by spectrophotometric method ecofriendly in ultraviolet region. **Scientifica**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

KOGAWA, A. C.; MELLO, N. P.; SALGADO, H. R. N. Quantification of doxycycline in raw material by an eco-friendly method of infrared spectroscopy. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 7, p. 463-466, 2016.

KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Ethanol on HPLC: Epiphany or Nonsense? **Acta Scientific Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 14-15, 2018.

KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Spectrophotometry in infrared region: a new, low cost and green way to analyze tablets of rifaximin. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 14, p. 108-111, 2018.

LAZAR, K.; WALKER, S. **S**ubstrate analogues to study cell-wall biosynthesis and its inhibition. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 786-793, 2002.

LEVINE, D.P. **Vancomycin: a history**. Clinical Infectious Diseases, v. 42, p. 5-12, 2006;

LIMA, J. G. S.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Green analytical method for quantification of secnidazole in tablets by HPLC-UV. **Drug Analytical Research** v. 02, p. 20-26, 2018.

LIMA, T.M.; SEBA, K.S.; GONÇALVES, J.C.S.; CARDOSO, F.L.L.; ESTRELA, C.E. A Rapid and Simple HPLC Method for Therapeutic Monitoring of Vancomycin. **Journal of chromatographic Science**, v. 56, n. 2, p. 115-121, 2018.

LIU, M.; YANG, Z.H.; LI, G.H. A Novel Method for the Determination of Vancomycin in Serum by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Its Application in Patients with Diabetic Foot Infections. **Molecules**, v. 23, p. 2-12, 2018.

LOC-CARRILLO, C.; WANG, C.; CANDEN, A.; BURR, M.; AGARWAL, J. Local intramedullary delivery of vancomycin can prevent the development of long bone Staphylococcus aureus infection. **Plos One**, v. 11, n. 7, p. 1-13, 2016.

MAO, Y.; ZHAO, M.; GE, Y.; FAN, J. Novel alginate–chitosan composite microspheres for implant delivery of vancomycin and in vivo evaluation**. Chemical Biology and Drug Design**, v. 88, n. 3, p. 434-440, 2016.

MATZKE, G.R.; ZHANEL, G.G.; GUAY, D.R.P. Clinical pharmacokinetics of vancomycin. **Clinical pharmacokineticsI**, p. 257-282, 1986.

MEI, S.; WANG, J.; ZHU, L.; CHEN, R.; LI, X.; CHEN, K.; CHEN, G.; ZHOU, J.; WANG, Q.; ZHAO, Z. An UPLC-MS/MS method for analysis of vancomycin in human cerebrospinal fluid and comparison with the chemiluminescence immunoassay. **Biomedical Chromatography**, v. 31, n. 8, p. 1-7, 2017.

MOLINA-MANSO, D.; MANZANO, M.; DOADRIO, J.C.; DEL PRADO, G.; ORTIZ-PÉREZ, A.; VALLET-REGÍ, M.; GÓMEZ-BARRENA, E.; ESTEBAN, J. Usefulness of SBA-

15 mesoporous ceramics as a delivery system for vancomycin, rifampicin and linezolid: a preliminary report. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 252-256, 2012.

MONTES, J.A.; JOHNSON, D.; JORGENSEN, J.; MCELMEEL, L.; FULCHER, L.C.; KIEL, J.W. Potency and sterility of fortified tobramycin, fortified vancomycin, and moxifloxacin at 4, 24, and 35°C for 14 Days. **Cornea**, v. 35, nº 1, p. 122-126, 2016.

MORAES, L.G.P.; ROCHA, R.S.F.; MENEGAZZO, L.M.; ARAÚJO, E.B.; YUKIMITU, K.; MORAES, J.C.S. Infrared spectroscopy: a tool for determination of the degree of conversion in dental composites. **Journal of Applied Oral Science**, v. 16, nº 2, p. 145-149, 2008.

MORENO, A.H.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of the quantitative analysis of ceftazidime in powder for injection by infrared spectroscopy. **Physical Chemistry**, v. 2, nº 1, p. 6-11, 2012.

NAGARAJAN, R. Structure-activity relationships of vancomycin-type glycopeptide antibiotics. **The Journal of Antibiotics**, v. 46, nº 8, p. 1181-1195, 1993.

NASCIMENTO, P.A.; KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. Development and validation of an innovative and ecological analytical method using high performance liquid chromatography for quantification of cephalothin sodium in pharmaceutical dosage. **Journal of Chromatography and Separation Techniques**, v. 9 nº 1, p. 1-8, 2018.

NASCIMENTO, P.A.; KOGAWA, A.C.; SALGADO, H.R.N. A green and sustainable method by infrared for quantitative determination of sodium cephalothin. **Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry**, v. 6, nº 2, p. 1-5, 2019.

O'DONNELL, J.N.; RHODES, N.J.; LODISE, T.P.; PROZIALECK, W.C.; MIGLIS, C.M.; JOSHI, M.D.; VENKATESAN, N.; PAIS, G.; CLUFF, C.; LAMAR, P.C.; BRIYAL, S.; DAY, J.Z.; GULATI, A.; SCHEETZ, M.H. 24-Hour Pharmacokinetic Relationships for

Vancomycin and Novel Urinary Biomarkers of Acute Kidney Injury. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 61, nº 11, p. 1-10, 2017.

OJEDA, C.B.; ROJAS, F.S. Process Analytical Chemistry: Applications of Ultraviolet/Visible Spectrometry in Environmental Analysis: An Overview. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, p. 245-265, 2009.

PARKER, S.L.; VALERO, Y.C.G.; LIPMAN, J.; ROBERTS, J.A.; WALLIS, S.C. Effect of time on recovery of plasma microsamples for the quantitative determination of vancomycin**. Bionalysis**, v. 8, nº 21, p. 2235-2242, 2016.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S**. Introduction to spectroscopy.** 5 ed. São Paulo, CENGAGE, 2016

PEDROSO, T. M.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Validation and routine application of a versatile bioassay for quantification of ertapenem sodium. **Research and Reviews: Journal of Pharmacology and Toxicological Studies**, v. 6, p. 1-9, 2018.

PIGRAU, C.; ALMIRANTE, B. Oxazolidinonas, glucopéptidos y lipopéptidos cíclicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, nº p. 236-246, 2009.

REBOUCAS, C. T.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. A new green method for the quantitative analysis of enrofloxacin by fourier-transform infrared spectroscopy. **Journal of AOAC International**, v.101, p. 2001-2005, 2018.

RECHELO, B. S.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Quantitative analysis of cefazolin sodium in lyophilized powder by infrared spectrophotometry: Green, low cost, fast and effective. **Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 208, p. 157-161, 2019.

RHODES, N.J.; PROZIALECK, W.C.; LODISE, T.P.; VENKATESAN, N.; O'DONNELL, J.N.; PAIS, G.; CLUFF, C.; LAMAR, P.C.; NEELY, M.N.; GULATI, A.; SCHEETZ, M.H. Evaluation of vancomycin exposures associated with elevations in novel

urinary biomarkers of acute kidney injury in vancomycin-treated rats. **Antimicrobial Agent and Chemoterapy**, v. 60, nº10, p. 5742-5751, 2016.

ROBERTS, R.; MCCONOUGHEY, S.J.; CALHOUN, J.H. Size and composition of synthetic calcium sulfate beads influence dissolution and elution rates in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 102B, p. 667-673, 2013.

RYBAK, M.J.; ALBRECHT, L.M.; BOIKE, S.C.; CHANDRASEKAR, P.H. Nephrotoxicity of vancomyrin, alone and with an aminoglycoside**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 25, p. 679-687, 1990.

SANTOS, N.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar**. Texto e Contexto Enfermagem**, v. 13, p. 64-70, 2004

SCHIMD, F.X. Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry.**Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-4, 2001.

SERRI, A.; MOGHIMI, H.R.; MAHBOUBI, A.; ZARGHI, A. Stability-indicating HPLC method for determination of vancomycin hydrochloride in the pharmaceutical dosage forms. **Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research**, v. 74, nº 1, p. 73-79, 2017.

SIERADZKI, K.; TOMASZ, A. Gradual alterations in cell wall structure and metabolism in vancomycin-resistant mutants of Staphylococcus aureus**. Journal of Bacteriology**, v. 181, nº 24, p. 7566-7570, 1999

SILVA, L.M.; SALGADO. H.R.N. Rapid turbidimetric assay to potency evaluation of tigecycline in lyophilized powder. **Journal of Microbiological Methods**, v. 110, p. 49-53, 2015.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7 ed., John Wiley and Sons New Jersey, 2005.

SMITH, T.L.; PEARSON, M.L.; WILCOX, K.R.; CRUZ, C.; LANCASTER, M.V.; ROBINSON-DUNN, B.; TENOVER, F.C.; ZERVOS, M.J.; BAND, J.D.; WHITE, E.;

JARVIS, W.R. Emergence of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus**. The New England Journal of Medicine**, v. 340, nº 7, p. 493-501, 1999.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3 ed., John Wiley and Sons New Jersey, 2010.

SONG, X.; XIE, J.; ZHANG, M.; ZHANG, Y.; LI, J.; HUANG, Q. Simultaneous determination of eight cyclopolypeptide antibiotics in feed by high performance liquid chromatography coupled with evaporation light scattering detection. **Journal of Chromatography B**, v. 1076, p. 103-109, 2018.

SORAN, M.L. Determination of antibiotics in surface water by solid-phase extraction and High-Performance Liquid Chromatography with diode array and mass spectrometry detection**. Environmental Analysis**, v. 50, nº 7, p. 1209-1218, 2016.

SORAN, M.L.; OPRIS, O.; LUNG, I.; KACSO, I.; PORAV, A.S.; STAN, M.; The efficiency of the multi-walled carbon nanotubes used for antibiotics removal from wastewaters generated by animal farms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, nº 19, p. 16396-16406, 2017.

SUCHÝ, T.; SUPOVÁ, M.; KLAPKOVÁ, E.; HORNÝ, L.; RÝGLOVÁ, S.; ZALOUDKOVÁ, M.; BRAUN, M.; SUCHARDA, Z.; BALLAY, R.; VESELÝ, J.; CHLUP, H.; DENK, F. The sustainable release of vancomycin and its degradation products from nanostructured collagen/hydroxyapatite composite layers. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 105, p. 1288-1294, 2016.

SWEETMAN, S.C. **Martindale: the complete drug reference.** 39. Ed. London: Pharmaceutical Press, 2017.

TAKÁCS-NOVÁK, K.; NOSZÁL, B.; TOKÉS-KÖVESDI, M.; SZÁSZ, G. Acid-base properties and proton-speciation of vancomycin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 89, p. 261-263, 1993.

THAMMANA, M.; A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Research and reviews: Journal of Pharmaceutical analysis**, v. 5, nº 2, p. 22-28, 2016.

THE MERCK INDEX. 13 ed. Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories Division of Merck co., inc., 2001.

TOMAS, A.H.; NEWLAND, P. Chromatographic methods for the analysis of vancomycin. **Journal of Chromatography**, v. 410, p. 373-3382, 1987.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 12ºed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TÓTOLI, E.G.; SALGADO, H.R.N. Rapid turbidimetric assay to determine the potency of daptomycin in lyophilized powder. **Pharmaceutics**, v. 7, p. 106-121, 2015.

TOYOGUCHI, T.; TAKAHASHI, S.; HOSOYA, J.; NAKAGAWA, Y.; WATANABE, H. Nephrotoxicity of Vancomycin and Drug Interaction Study with Cilastatin in Rabbits. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, nº 9, p. 1985-1990, 1997.

UENG, S.W.N.; YUAN, L.J.; LIN, S.S.; LIU, S.J.; CHAN, E.C.; CHEN, K.T.; LEE, M.S. In vitro and in vivo analysis of a biodegradable poly(lactide-*co*-glycolide) copolymer capsule and collagen composite system for antibiotics and bone cells delivery. **Journal of Trauma Injury, Infection and Critical Care**, v. 70, p. 1503-1509, 2011.

UENG, S.W.N.; HSIEH, P.H.; SHIH, H.N.; CHAN,Y.S.; LEE, M.S.; CHANG, Y. Antibacterial activity of joint fluid in cemented total-knee arthroplasty: an *in vivo* comparative study of polymethylmethacrylate with and without antibiotic loading. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 5541-5546, 2012.

URABE, K.; NARUSE, K.; HATTORI, H.; HIRANO, M.; UCHIDA, K.; ONUMA, K.; PARK, H.J.; ITOMAN, M. In vitro comparison of elution characteristics of vancomycin from calcium phosphate cement and polymethylmethacrylate. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 14, p. 784-793, 2010.

USMAN, M.; HEMPLE, G. Development and validation of an HPLC method for the determination of vancomycin in human plasma and its comparison with an immunoassay (PETINIA). **SpringerPlus**, v. 5, nº 124, p. 1-7, 2016.

UTTLEY, A.H.C.; COLLINS, C.H.; NAIDOO, J.; GEORGE, R.C. Vancomycin-resistant enterococci. **The Lancet**, v. 2, nº 9, p. 57-58, 1988.

VANCOCINA® CP. **Bula cloridrato de vancomicina**. São Paulo, 2014. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=5497142014&pIdAnexo=2117009. Acesso em 02 de abril de 2019.

VILA, M.M.D.C.; OLIVEIRA, R.M.; GONÇALVES, M.M. Analytical methods for vancomycin determination in biological fluids and in pharmaceuticals**. Quimica Nova**, v. 30, nº 2, p. 395-399, 2007.

WAYLAND, L.G.; WEISS, P.J. Identification of antibiotics in sensitivity discs**. Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, p. 806-810, 1968.

WICHA, S.G.; KLOFT, C. Simultaneous determination and stability studies of linezolid, meropenem and vancomycin in bacterial growth medium by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 15, nº 1028, p. 242-248, 2016.

WILLIAMS, D.H.; BARDSLEY, B. The vancomycin group of antibiotics and the fight against resistant bacteria. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, p. 1172-1193, 1999.

WORKING, Z.M.; FREDERIKSEN, H.; DREW, A.; LOC-CARRILLO, C.; KUBIAK, E.N. Bone penetrance of locally administered vancomycin powder in a rat femur fracture model. **Injury**, v. 48, nº 7, p. 1459-1465, 2017.

WRIGHT, P.M.; SEIPLE, I.B.; MYERS, A.G. The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery. **Angewandte Chemie International Edition England**, v. 53, nº 34, p. 8840-8869, 2015.

YAMAZAKI, S.; SUZUKI, T.; SUZUKI, T.; TAKATSUKA, H.; ISHIKAWA, M.; HATTORI, N.; FUJISHIRO, T.; MIYAUCHI, H.; OAMI, T.; ARIYOSHI, N.; ODA, S.; MATSUBARA, H.; ISHII, I. An extremely high bioavailability of orally administered vancomycin in a patient with severe colitis and renal insufficiency**. Journal of Infection and Chemotherapy**, p. 1-4, 2017.

ZAID, A.N.; AL-RAMAHI, R.J.; GHOUSH, A.A.; QADDUMI, A.; ZAAROR, Y.A. Weight and content uniformity of lorazepam half-tablets: A study of correlation of a low drug content product**. Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p.71-75, 2013.

ZARIF, M.S.; AFIDAH, A.R.; ABDULLAH, J.M.; SHARIZA, A.R. Physicochemical characterization of vancomycin and its complexes with β-cyclodextrin. **Biomedical research India**, v. 23, nº 4, p. 513-520, 2012.

ZULUAGA, A.F.; AGUDELO, M.; RODRIGUEZ, C.A.; VESGA, O. Application of microbiological assay to determine pharmaceutical equivalence of generic intravenous antibiotics. **BMC Clinical Pharmacology**, v. 9, p. 1-11, 2009.