

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA A QUANTIFICAÇÃO DE TEICOPLANINA INJETÁVEL POR
TURBIDIMETRIA**

THALES BARBOSA MORAES DE OLIVEIRA

Araraquara

2012

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA A QUANTIFICAÇÃO DE TEICOPLANINA INJETÁVEL POR
TURBIDIMETRIA**

THALES BARBOSA MORAES DE OLIVEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à coordenação do Curso de
Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista, para obtenção do
grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Orientador: Prof^a. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Araraquara
2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, por ter me iluminado, amparado e ter me proporcionado a oportunidade de concluir mais esta etapa da minha vida, e a todos que me ajudaram ao longo dessa trajetória:

Aos meus pais, Samuel e Cidinha, pessoas especiais, por estarem sempre presentes, me dando forças e apoio em todos os momentos de minha vida para que eu não desistisse nunca.

Aos meus avós, Edith e Itamar, que mesmo distantes do meu local de estudo estiveram sempre orando e torcendo por mim. E à minha irmã Mariana, por me incentivar sempre.

À professora Hérica Regina Nunes Salgado, minha orientadora, obrigado por confiar em meu trabalho e por me incentivar sempre, seja no conhecimento técnico-científico, nas palavras amigas ou no sorriso tenro.

À toda equipe do laboratório de Controle de Qualidade Biológico de Fármacos e Medicamentos da FCFAr, a qual me ajudou muito a sanar minhas dúvidas no andamento deste projeto e esteve presente nos momentos em que mais precisava de orientação.

Ao professor João Aristeu da Rosa, tutor do grupo PET Farmácia, meu grande mestre e amigo, que paralelamente às atividades do grupo PET, sempre me incentivou, indicando meu potencial e agregando acima de tudo um conhecimento e uma consciência de ser sempre uma pessoa melhor no ambiente em que você está inserido.

Aos meus grandes amigos: Yuri Barreto, farmacêutico, amigo e um grande irmão, que mesmo distante parecia estar muito próximo; Kairo Dias, amigo que comprovou que mesmo passando muito tempo sem manter contato não deixou de torcer por mim e desejar meu melhor; Abel Martins que sempre compartilhou dos mesmos pensamentos filosóficos de vida; Marília e Marina

Verzola, duas grandes irmãs, e minhas grandes amigas, só tenho uma coisa a dizer a vocês: muito obrigado pelas palavras sinceras sempre; Marina Garcia, uma pessoa indescritível, que talvez me mostrou um outro lado dessa vida, o qual muitas vezes não enxerguei.

Aos meus amigos da 79ª Turma de Farmácia-Bioquímica da Unesp/Araraquara, mas especialmente à: Juliana Darini, por todo apoio, como você mesma diz: “obrigado por existir!”; Bárbara Villela, mesmo nas brigas não deixamos de ter opiniões bem parecidas; Camila Capel, pessoa muito sábia e sincera.

Aos meus amigos de república: Daniel, Pedro e Warley, a convivência com vocês foi essencial para o meu crescimento como pessoa hoje. Obrigado pelos conselhos, risadas, puxões de orelha, apoio e tudo o mais que essa “família” pode agregar.

Aos meus amigos do grupo PET Farmácia, vocês são mais que uma família.

A toda equipe All Pharma Júnior, em especial à Diretoria de Recursos Humanos (Gestão 2011-2012), pois com todas vocês, além de ter atravessado e superado vários desafios, aprendi o valor de se ter um objetivo em mente e nunca desistir dele, além de ter conhecido pessoas especiais que se tornaram minhas amigas.

Ao meu grande amor, Guel, que nunca desistiu de mim, por toda sua ajuda, paciência e companheirismo durante todo esse tempo. Obrigado pelas lições trazidas sempre e por me abrir novas portas para um novo mundo. Sempre acreditarei!

RESUMO

A teicoplanina é um complexo antibiótico glicopeptídico derivado do *Actinoplanes teichomyceticus*, ativo contra bactérias Gram-positivas resistentes a outros antibióticos. Seu espectro de ação é similar ao da vancomicina, sendo, porém mais ativo para *Streptococcus faecalis* e *Clostridium difficile*. Seu uso é indicado para profilaxia de endocardite, peritonite, osteomielite e para septicemia estafilocócica. No Brasil, a teicoplanina é comercializada sob a forma farmacêutica de pó liofilizado, que deve ser reconstituído antes da administração. O medicamento de referência é o Targocid®, produzido pelo laboratório Sanofi-Aventis, em duas apresentações, 66 mg/mL e 133 mg/mL. A teicoplanina, bem como a vancomicina, inibe a síntese da parede celular bacteriana, pois a molécula se liga ao precursor da parede D-alanil-D-alanina, formando um complexo, impedindo a ligação à porção terminal do peptidoglicano, que é o alvo das enzimas transglicolase e transpeptidase. Desse modo, não há incorporação de aminoácidos aos glicopeptídeos integrantes da parede celular das bactérias Gram-positivas. No estudo de validação, foram aplicados os parâmetros de linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, especificidade, exatidão e robustez. O método desenvolvido e validado para a quantificação de teicoplanina pó liofilizado foi: Ensaio microbiológico por turbidimetria na faixa de concentração de 20,0 a 80,0 µg/mL, utilizando o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150. Os parâmetros estudados para a validação do método turbidimétrico atenderam a todas as especificações para a adequada quantificação de teicoplanina na forma farmacêutica pó liofilizado.

Palavras-chave: controle de qualidade, ensaio microbiológico, teicoplanina, turbidimetria, validação.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Material	17
3.2. Soluções e Reagentes.....	18
3.3. Equipamentos	18
3.4. Método (Ensaio Preliminar)	19
3.4.1. Preparação do Inóculo.....	19
3.4.2. Preparação das Soluções.....	19
3.4.3. Obtenção da Curva Analítica	21
3.5. Método (Validação Analítica)	21
3.5.1 Linearidade	21
3.5.2. Precisão	22
3.5.3. Exatidão	23
3.5.4. Robustez	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
5. CONCLUSÃO.....	30

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
-------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS (ordem alfabética)

A - Amostra

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

IAL – Instituto Adolfo Lutz

P- Padrão

USP – United States Pharmacopei

1. INTRODUÇÃO

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

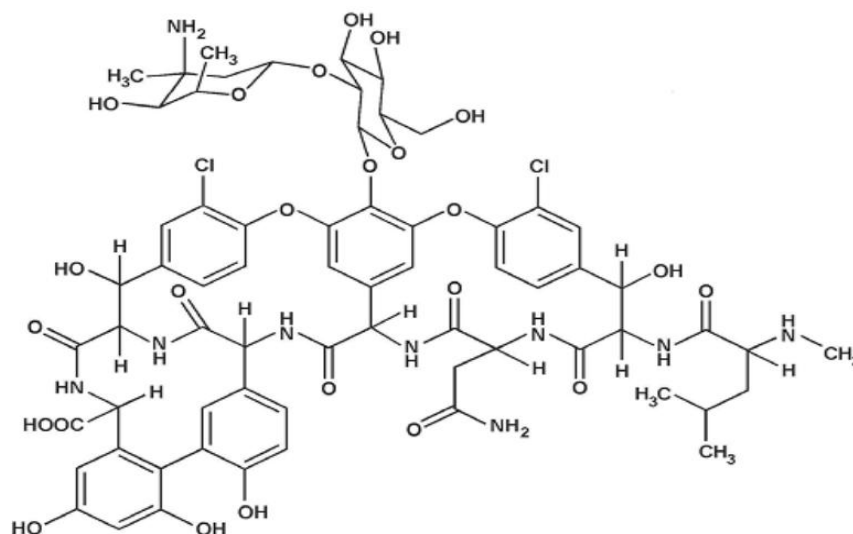
Os glicopeptídeos são antibióticos que ressurgiram com o aparecimento de infecções causadas por *Staphylococcus* metilina resistente, proveniente tanto de *Staphylococcus aureus* quanto de *Staphylococcus epidermidis*. São substâncias bactericidas, à exceção do *Enterococcus* spp quando exerce ação bacteriostática. São usados contra bactérias Gram-positivas resistentes a outros antibióticos (OLIVEIRA, 1999). A ação dos glicopeptídeos se dá pela inibição da síntese da parede celular bacteriana, pois a molécula se liga ao precursor da parede D-alanil-D-alanina, formando um complexo, impedindo a ligação à porção terminal do peptidoglicano, que é o alvo das enzimas transglicolase e transpeptidase. Desse modo, não há incorporação de aminoácidos aos glicopeptídeos integrantes da parede celular das bactérias Gram-positivas (SILVA, 2006).

Em 1956, foi isolado o antibiótico glicopeptídico vancomicina (Fig. 1), obtido da bactéria *Streptomyces orientalis* sendo introduzida no mercado em 1958 pelo Laboratório Lilly, a primeira molécula representante da classe dos glicopeptídeos (VILA *et al.*, 2007). O fármaco apresenta atividade contra

bactérias Gram-positivas, especialmente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* e *Clostridium difficile*. Apesar de a vancomicina ter se mostrado importante no tratamento de infecções causadas por estafilococos penicilina-resistentes, esse fármaco possui alguns efeitos adversos indesejáveis que podem diminuir a adesão ao tratamento como, hipotensão arterial, broncoespasmo, urticária, prurido e flebite no local da injeção. É conhecida ainda a “Síndrome do homem vermelho”, um rubor na parte superior do corpo com espasmos dos músculos do tórax, que pode durar de 20 minutos a algumas horas (OLIVEIRA, 1999). Seus efeitos adversos de nefrotoxicidade e/ou ototoxicidade podem ainda ser maximizados quando interagem com aminoglicosídeos, anfotericina B, bumetanida, carmustina, cisplatina, ciclosporina e furosemida (SILVA, 2006). A partir da descoberta deste fármaco houve um grande interesse dos pesquisadores em conhecer e desenvolver novos compostos dessa classe, com maior atividade e menores efeitos tóxicos.

Figura. 1 - Estrutura química da vancomicina.

Fonte: VILA et al., 2007.

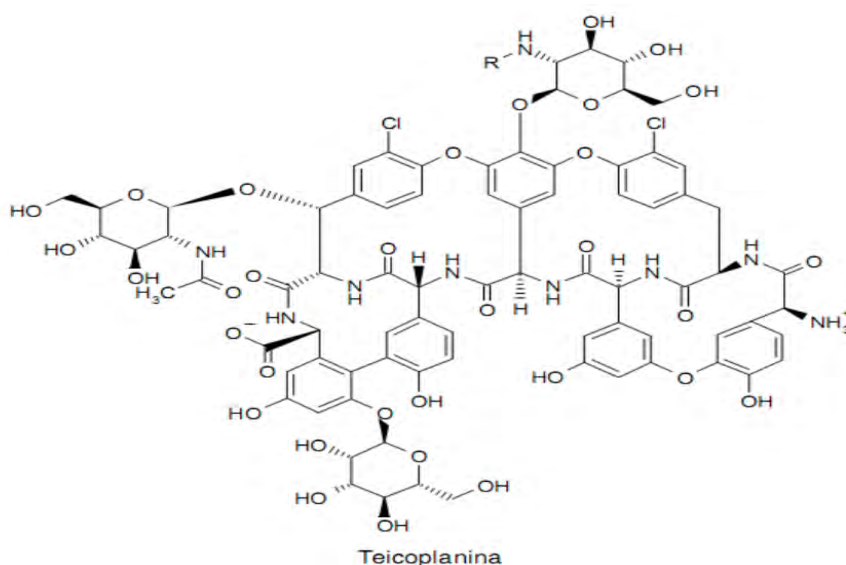


A teicoplanina também pertencente a esta classe foi isolada do micro-organismo *Actinoplanes teichomyceticus*, em 1978, sendo introduzido no mercado em 1991, no Reino Unido. Muito embora esse composto não tenha sido aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso nos EUA, a teicoplanina está disponível na Europa (GOODMAN e GILMAN, 2003). Atualmente, tem sido utilizada amplamente no tratamento contra bactérias Gram-positivas (MATTHEWS *et al.*, 2007). Apresenta ainda espectro de ação similar ao da vancomicina, sendo, porém mais ativo que esta para *Streptococcus faecalis* e *Clostridium difficile* (OLIVEIRA, 1999).

A estrutura química da teicoplanina é constituída por cinco componentes principais, designados A2-1, A2-2, A2-3, A2-4 e A2-5, cada qual com uma diferente molécula de ácido graxo. Esses constituintes da molécula são análogos glicopeptídeos com peso molecular que variam de 1564,3 a 1907,7 (BERNAREGGI *et al.*, 1992). Sua estrutura química está representada pela Figura 2.

Figura 2 – Estrutura química da teicoplanina.

Fonte: GARCIA QUETGLAS *et al.*, 2003.



A teicoplanina (Fig. 2) é utilizada no tratamento contra bactérias Gram-positivas causadoras de doenças como endocardite, peritonite, osteomielite e para septicemia estafilocócica, sendo em alguns casos de uso profilático (OLIVEIRA, 1999). Um dos produtos comercializados no Brasil é o Bactomax®, sob a forma de pó liofilizado nas concentrações de 200 e 400 mg/mL, produzido pelo laboratório Cristália, sendo esse o medicamento utilizado no presente trabalho.

Com o advento desse novo fármaco, os efeitos adversos que a vancomicina causava tornaram-se menos frequentes com o uso da teicoplanina (OLIVEIRA, 1999). Além disso, a teicoplanina mostra-se farmacocineticamente melhor em relação à vancomicina, em alguns pontos, e trouxe também alguns benefícios. Ela pode ser administrada por via intramuscular (GOODMAN e GILMAN, 2003). Sua ligação às proteínas plasmáticas é de 90-95% (GOODMAN e GILMAN, 2003), enquanto a vancomicina apresenta ligação de 10 a 55% (RANG *et al.*, 2001). A biodisponibilidade da teicoplanina intramuscular é de 90-92%, e sua concentração máxima é alcançada em 2 a 4 horas após a administração (GARCIA QUETGLAS *et al.*, 2003). Em relação à meia-vida, a vancomicina fica cerca de 8 horas presente no plasma (RANG *et al.*, 2001), já a teicoplanina tem meia-vida de eliminação sérica extremamente longa, de até 100 horas em pacientes com função renal normal (GOODMAN e GILMAN, 2003).

Entretanto, apesar de ser comercializado em vários países, não é possível encontrar muitos métodos analíticos para este fármaco. Na literatura, podemos encontrar estudos com relação à atividade antimicrobiana, farmacodinâmica e farmacocinética evidenciado nos trabalhos de YENICE e

colaboradores (2003), SIPAHI e colaboradores (2005), ÖZKAN e colaboradores (2005), MATTHEWS e colaboradores (2007), ATAHAN e colaboradores (2007) e GHISELLI e colaboradores (2008). No entanto, há poucos estudos com relação estrutura-atividade, interações medicamentosas e principalmente sobre desenvolvimento de metodologia analítica para esse fármaco.

Os métodos microbiológicos para teicoplanina encontrados são escassos, alguns envolvendo o método de difusão em ágar presente na 15ª edição da farmacopeia japonesa (2006), porém não é o mais indicado para a indústria farmacêutica, pois é bastante demorado, sendo o resultado final obtido após três dias, o que acarreta em atrasos na produção. Em relação ao método turbidimétrico foi encontrado apenas o trabalho de PASSONI (2009), porém ainda sem grandes sucessos no uso das concentrações da metodologia analítica empregada.

O ensaio microbiológico por turbidimetria consiste na inoculação do meio de cultura recomendado para o ensaio com quantidade conhecida do micro-organismo sensível ao antibiótico, de modo que, após incubação aproximada de quatro horas, a turbidez bacteriana no meio seja facilmente quantificada e mantenha correlação entre a dose e a resposta da substância em análise. É recomendado que o ensaio seja executado com três soluções com concentrações que devem estar em progressão geométrica tanto para a amostra como para o padrão (F. Bras. V, 2010).

Este fato justifica a importância de desenvolver métodos microbiológicos sensíveis para a quantificação de antimicrobianos e que possam ser aplicados na rotina de laboratórios de controle de qualidade.

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método desenvolvido é apropriado para determinações qualitativas, quantitativas e/ou semi-quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003).

A validação deve garantir por meio de estudos experimentais que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando confiabilidade dos resultados.

Segundo a RDC 899/2003 da ANVISA, os métodos analíticos podem ser classificados em quatro categorias de acordo com a sua finalidade.

Categoria I – Testes quantitativos para a determinação da substância ativa em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.

Categoria II – Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.

Categoria III – Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).

Categoria IV – Testes de identificação.

Para cada tipo de metodologia analítica desenvolvida (categoria), um conjunto de testes é exigido (Tabela 1).

Tabela 1 Ensaio necessários para a validação do método analítico segundo sua finalidade

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

*pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

**se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Fonte: BRASIL, 2003a.

O método de doseamento microbiológico por turbidimetria se enquadra a categoria I, pois se trata de um teste quantitativo, o qual se deseja determinar a substância ativa em produtos farmacêuticos ou matérias-primas, como foi feito neste trabalho de conclusão de curso.

Portanto, os parâmetros que foram ensaiados foram: linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez.

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

Intervalo: é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico.

Precisão: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

Esta é considerada em três níveis.

Repetibilidade (precisão intradia): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Precisão intermediária (precisão interdias): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

Exatidão: é a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico em estudo em relação ao valor verdadeiro. Pode ser determinada por diversas maneiras. No caso de estudo com o fármaco pode-se (a) aplicar o método analítico proposto na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência), ou (b) comparar os resultados obtidos com aqueles resultantes de um segundo método bem caracterizado, cuja exatidão tenha sido estabelecida.

Robustez: é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003a).

2. OBJETIVO

Desenvolver e validar método analítico para teicoplanina injetável empregando o ensaio microbiológico de turbidimetria, a fim de reduzir o tempo de análise microbiológica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Para a realização dos ensaios preliminares e de validação foram utilizadas as seguintes vidrarias e materiais:

- tubos de ensaio grandes
- balões volumétricos de 100 mL
- balões volumétricos de 10 mL
- béquer com volumes variados
- ponteiras
- erlenmeyer de 1000 mL, 500 mL e 250 mL
- tampões de algodão
- espátulas para pesagem
- pipetadores automáticos
- pipetas de 10 mL
- papéis de pesagem
- pipetas de Pasteur

3.2. Soluções e Reagentes

A substância química referência utilizada foi a teicoplanina, teor de 99,7% e as amostras foram frascos-ampola de concentração 200 mg, com o nome comercial Bactomax®, ambos doados pelo Laboratório Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA (Itapira, SP, Brasil).

Para a preparação das soluções de padrão e amostra de teicoplanina foi utilizada água purificada. Para a interrupção do crescimento bacteriano foi utilizado formaldeído 12%.

Para o ensaio preliminar foram utilizadas cepas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150, padronizadas e incubadas em caldo BHI - Brain Heart Infusion (Acumedia, EUA).

3.3. Equipamentos

A substância química de referência e a amostra foram pesadas em balança analítica, METTLER, modelo H10 e os demais produtos foram pesados em balança semi-analítica, Micronal B160.

Durante o ensaio microbiológico, os materiais necessários foram esterilizados em autoclave PHOENIX e estufa de secagem e esterilização NOVA ÉTICA, para a incubação microbiana foram utilizados a estufa de incubação ODONTOBRÁS, modelo ECB 1.2. e Shaker Marconi modelo MA420. Para as leituras foi utilizado o espectrofotômetro Beckman modelo DU® 530. A água foi purificada em sistema Millipore MilliQ ® (Millipore, Milford, USA).

3.4. Método (Ensaio preliminar)

3.4.1 Preparação do Inóculo

O *S. epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150 foi inoculado em caldo BHI e incubado em estufa microbiológica a $35,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 18 horas. A padronização deste inóculo foi feita em espectrofotômetro a 580 nm, obtendo-se transmitância de $25,0\% \pm 2,0\%$.

3.4.2 Preparação das Soluções

Para os testes preliminares, foram utilizadas três concentrações, 20,0; 40,0 e 80,0 $\mu\text{g/mL}$. Foram pesados 40,0 mg de teicoplanina substância referência e transferidas para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água purificada, para obtenção de solução de teicoplanina com concentração teórica de 400,0 $\mu\text{g/mL}$. Desta solução, foram transferidas alíquotas de 0,5; 1,0 e 2,0 mL para balões volumétricos de 10 mL completando o volume com água purificada para obtenção de soluções de concentrações de 20,0; 40,0 e 80,0 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). Estas soluções foram preparadas em triplicatas. As soluções amostra foram obtidas a partir do pó liofilizado de Bactomax®, da mesma forma que o padrão.

Tabela 2 - Preparo das soluções utilizadas nos testes preliminares do ensaio microbiológico por turbidimetria

<i>Solução</i>	<i>Volume de teicoplanina 400 µg/mL (mL)</i>	<i>Volume de água (mL)</i>	<i>Concentração final (µg/mL)</i>
1	0,5	9,5	20
2	1,0	9,0	40
3	2,0	8,0	80

Após a preparação e a padronização do inóculo em espectrofotômetro, em fluxo laminar, em tubos de ensaio contendo 10,0 mL de caldo BHI previamente esterilizados foram adicionados 200 µL de cada uma das soluções padrão e amostra e 400 µL de caldo nutriente inoculado. Foram preparados também os controles negativo (apenas caldo BHI estéril) e positivo (caldo BHI estéril e 400 µL de caldo nutriente inoculado).

Estes tubos foram incubados em banho sob agitação mecânica por quatro horas a 37 °C ± 1 °C, decorrido o tempo de incubação, o crescimento bacteriano foi interrompido com a da adição de 0,5 mL de formaldeído 12%, em todos os tubos, inclusive nos controles negativo e positivo.

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

No ensaio foram utilizados 20 tubos, contendo 10 mL de caldo BHI divididos da seguinte forma:

- 9 tubos contendo solução padrão, sendo 3 tubos para cada concentração;
- 9 tubos contendo solução de amostra, sendo tubos para cada concentração;
- 1 tubo para o controle positivo, contendo somente caldo BHI e o inóculo testado;
- 1 tubo para o controle negativo, contendo somente o caldo BHI.

3.4.3 Obtenção da Curva Analítica

Para a obtenção das curvas analíticas de teicoplanina injetável foram adicionados em cada tubo 10 mL de caldo BHI estéril, 400 µL de inóculo padronizado e 200 µL da solução padrão. Para o preparo das soluções padrão, foram transferidas alíquotas de 0,5; 1,0 e 2,0 mL da solução padrão de teicoplanina (400 µg/mL) para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com água, desta forma foram obtidas três concentrações finais (20, 40 e 80 µg/mL).

3.5 Método (Validação Analítica)

3.5.1 Linearidade

Os dados obtidos na construção da curva analítica, descrita no item 3.4.3, foram analisados pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade e paralelismo foi constatada por meio da ANOVA.

3.5.2 Precisão

A precisão foi testada pela realização de ensaios de doseamento de teicoplanina pó liofilizado, durante três dias seguidos. Os desvios padrão dos dados foram calculados estatisticamente. A precisão intradia, também foi testada para avaliar a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Tabela 3 – Resultados obtidos nos testes de precisão interdia do ensaio microbiológico por turbidimetria

Dia 1	112,57
Dia 2	105,92
Dia 3	94,91
Média	104,47
DP	8,919
DPR%	8,538

Tabela 4 – Resultados obtidos nos testes de precisão intradia do ensaio microbiológico por turbidimetria

1	0,710
2	0,699
3	0,716
4	0,686
5	0,700
6	0,724
7	0,694
Média	0,704
DP	0,013
DPR%	1,874

3.5.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação, aplicando a técnica de adição de padrão. As amostras foram preparadas segundo a Tabela 5.

Tabela 5: Preparo das soluções para o teste de recuperação do método turbidimétrico

	<i>Volume adicionado de amostra (400 µg/mL) (µL)</i>	<i>Volume adicionado de teicoplanina SQR (400 µg/mL) (µL)</i>	<i>Concentração final (µg/mL) *</i>
Amostra	500	-	20
R1	500	300	32
R2	500	500	40
R3	500	700	48

*diluída em balão volumétrico de 10 mL com água.

Cada nível de concentração foi preparado em triplicata e as concentrações de padrão também foram preparadas em triplicata, seguindo os valores de 20, 40 e 80 (µg/mL).

A percentagem de teicoplanina recuperada foi calculada pela equação da reta, seguido pela equação abaixo (AOAC, 2002).

$$\%R = [(Cr-Ca)/Cp] \times 100, \text{ em que:}$$

C_r = concentração da solução amostra adicionada da substância química de referência ($\mu\text{g/mL}$)

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

C_p = concentração teórica da substância química de referência adicionada ($\mu\text{g/mL}$)

3.5.4 Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação dos parâmetros: comprimento de onda no espectrofotômetro de leitura e tempo de incubação no shaker.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

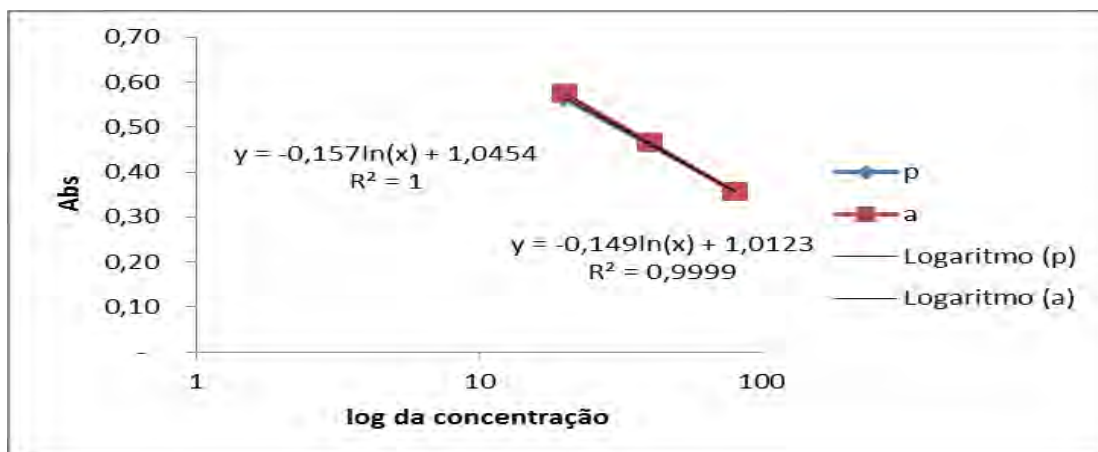
Os valores das absorvâncias obtidas pelas diferentes concentrações de teicoplanina SQR e amostra são mostrados na Tabela 5.

Tabela 6: Valores das absorvâncias determinados para a construção da curva analítica de teicoplanina, pelo método turbidimétrico

Concentração (µg/mL)	P1 (20)	P2 (40)	P3 (80)	A1 (20)	A2 (40)	A3 (80)
1	0,524	0,475	0,367	0,543	0,449	0,385
2	0,571	0,482	0,397	0,579	0,487	0,368
3	0,598	0,431	0,308	0,600	0,462	0,315
Média	0,564	0,463	0,357	0,574	0,466	0,356
CV%	6,64	5,98	12,67	5,02	4,14	10,26

As curvas analíticas de teicoplanina SQR e amostra (Figura 3) foram construídas com as médias dos valores das absorvâncias de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade e paralelismo. As equações da reta, determinadas pelo método dos mínimos quadrados, são: $y = -0,149\ln(x) + 1,0123$, com um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9999, para a teicoplanina SQR e $y = -0,157\ln(x) + 1,0454$, com r de 1 para as amostras.

Figura 3: Curvas analíticas de soluções de teicoplanina SQR e amostra, em concentrações de 20,0; 40,0 e 80,0 µg/mL, obtidas pelo método turbidimétrico.



A ANOVA calculada para os dados das curvas analíticas de teicoplanina é mostrada na Tabela 7

Tabela 7: Análise de variância dos valores de absorvância determinados na obtenção das curvas analíticas de teicoplanina SQR, utilizando o método turbidimétrico

Fontes de variação	gL	SQ	QM	Fcal	Ftab.
Preparação	1	0,0001	0,0001	0,06	4,96
Regressão	1	0,1355	0,1355	126,00	4,96
Paralelismo	1	0,0001	0,0001	0,08	4,96
Quadrático	1	0,0000	0,0000	0,01	4,96
Desvios de linearidade					
Diferença de quadrático	1	0,0000	0,0000	0,00	4,96
Tratamentos	5	0,14	0,03	25,23	3,33
Blocos (placas ou tubos)	2	0,00	0,00	1,28	4,10
Dentro (erro)	10	0,01	0,00	
Total	17	0,15	

Os valores da potência (%) de teicoplanina, determinados durante o ensaio de precisão do método proposto, encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8: Valores determinados para o doseamento de teicoplanina, pelo método turbidimétrico

Dia 1	112,57
Dia 2	105,92
Dia 3	94,91
Média	104,47
DP	8,919
DPR%	8,538

Na Tabela 9 são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método turbidimétrico.

Tabela 9: Valores do teste de recuperação do método turbidimétrico

Recuperação	Porcentagem
1	102,34
2	98,55
3	100,70
Média	100,53
DP	2,68
DPR%	2,66

A robustez do método foi determinada pela variação de dois parâmetros: comprimento de onda de leitura no espectrofotômetro e tempo de incubação no shaker (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10: Valores da determinação da robustez do método turbidimétrico variando o tempo de incubação no shaker

Parâmetro	Potência
3h45	124,60
4horas	97,45
4h15	92,79
Média	104,95
DP	17,18
DPR%	16,37

Tabela 11: Valores da determinação da robustez do método turbidimétrico variando o comprimento de onda no espectrofotômetro de leitura

Comprimento de onda (nm)	Potência (%)
525	96,05
530	97,45
535	97,49
Média	97,00
DP	0,82
DPR%	0,85

O ensaio microbiológico por turbidimetria é um método que não se restringe à quantificação de fármacos, mas que pode também ser empregado na observação de mudanças nas características de potência destas substâncias frente aos micro-organismos-teste (USP 31, 2008). O método turbidimétrico é de manejo simples e utiliza reagentes de baixo custo. Além disto, é capaz de determinar a potência em concentrações baixas de analito. Métodos microbiológicos são os únicos capazes de determinar a potência de agentes antimicrobianos e, embora consumam maior tempo de análise, esta desvantagem foi praticamente eliminada com a validação de um ensaio turbidimétrico.

No desenvolvimento do método turbidimétrico para teicoplanina pó liofilizado foram testadas concentrações da substância química de referência que variaram de 10 a 100,0 µg/mL. Finalmente, foram escolhidas as concentrações 20,0; 40,0 e 80,0 µg/mL, uma vez que apresentaram a melhor resposta frente ao micro-organismo e mantiveram a correlação entre a dose e a resposta da substância em análise, como recomendado pela Farmacopeia Brasileira (2010). A utilização do micro-organismo *S. epidermidis* baseia-se na sua sensibilidade frente à teicoplanina e pela facilidade de crescimento, manuseio e manutenção deste micro-organismo.

A linearidade do método foi comprovada pelos componentes de paralelismo, coeficiente de correlação e análise de variância dos dados da curva analítica.

A análise estatística demonstrou que não existe desvio da linearidade nas curvas analíticas originadas da substância química de referência e amostra. Os coeficientes de determinação são 0,9999 e 1 para a substância química referência e para as amostras, respectivamente, os quais são excelentes tratando-se de um ensaio biológico. Foi evidenciado, estatisticamente, que não existe diferença significativa na inclinação das curvas analíticas da substância química de referência e da amostra.

No ensaio de precisão o desvio padrão relativo das absorvâncias obtidas pela inibição do crescimento bacteriano no doseamento da amostra foi, em média, de 8,538%, limite aceitável para um ensaio microbiológico conforme recomendado os 15% (BRASIL, 2003a). Os valores obtidos para o teste de precisão intradia e interdia de 1,874 e 8,538%, respectivamente, validando assim a precisão do método turbidimétrico para análise de teicoplanina.

A quantidade de teicoplanina presente nas amostras analisadas, 104,47%, está de acordo com o compêndio oficial que é de 90,0 a 112,0% (Farmacopeia Japonesa 15, 2006).

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo estimada a média de 100,53%.

Como observado pela Tabela 11, o método se mostrou robusto para o comprimento de onda de leitura no espectro. O valor de desvio padrão relativo foi 0,85%, que respeitou o limite de 15% aceitável para ensaios microbiológicos (BRASIL, 2003a). Durante a etapa de validação a robustez do método também foi testada variando-se o tempo de incubação no shaker, porém este parâmetro não atendeu o limite aceitável de 15%, como pode ser observado pela Tabela 10. Portanto, deve existir rigorosidade quanto a este parâmetro, que não deve sofrer variações.

5. CONCLUSÃO

No estudo de validação, foram aplicados os parâmetros de linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, especificidade, exatidão e robustez.

O método desenvolvido e validado para a quantificação de teicoplanina pó liofilizado foi o ensaio microbiológico – método turbidimétrico na faixa de concentração de 20,0 a 80,0 $\mu\text{g/mL}$, utilizando o micro-organismo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 IAL 2150.

Os parâmetros estudados para a validação do método turbidimétrico atenderam a todas as especificações para a adequada quantificação de teicoplanina na forma farmacêutica pó liofilizado.

Assim sendo, pode-se concluir que este trabalho de conclusão de curso, conseguiu atingir seu objetivo que era de desenvolver e validar uma metodologia analítica para o fármaco teicoplanina pó liofilizado. Estudos posteriores relacionados a este fármaco podem utilizar este trabalho para fundamentação de suas pesquisas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 17th ed. Gaithersburg: AOAC, 2002. v.1, p.xx.

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

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

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

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. I, p. 261-269; v. II, p. 75-87.

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

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

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

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

JAPANESE PHARMACOPEIA (JP). 15th. ed. Tokyo, Society of Japanese Pharmacopeia, 2006.

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

OLIVEIRA, J. B. A. *Antibióticos*. Taubaté, Cabral Editora Universitária, 1999. p.132-134.

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

PASSONI, M.H., SALGADO, H.R.N. Development and validation a new and rapid HPLC for determination of lyophilized teicoplanin. *Analytical Methods*, v.4; p.1560-1564, 2012.

PASSONI, M.H. Análise químico-farmacêutica de teicoplanina em pó liofilizado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Araraquara, 2009. Dissertação Mestrado.

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

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

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

USP 31. UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP). 31st ed Rockville. United States Pharmacopoeia Convention: Rockville, 2008.

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

YENICE, I.; ÇALIS, S.; ATILLA, B.; KAS, H.S.; OZALP, M.; EKIZOGLU, M.; BILGILI, H.; HINCAL, A.A. In vitro/in vivo evaluation of efficiency of teicoplanin loaded biodegradable microparticles formulated for implantation to infected bone defects. **Journal of Microencapsulation**, v.20, p.705-717, 2003.