

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

ROGÉRIO RODRIGUES VILAS BOAS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE VANCOMICINA EM SORO POR CLAE-DAD E
ELABORAÇÃO DE PROTOCOLO DE MONITORIZAÇÃO
TERAPÊUTICA EM UTI NEONATAL

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2016

ROGÉRIO RODRIGUES VILAS BOAS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE VANCOMICINA EM SORO POR CLAE-DAD
E ELABORAÇÃO DE PROTOCOLO DE MONITORIZAÇÃO
TERAPÊUTICA EM UTI NEONATAL

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia, do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Biomédica, Universidade
Tecnológica Federal do Paraná.
Área de Concentração: Instrumentação
Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Bertoldo Schneider Jr
Co-orientador: Prof. Dr. Marco André Cardoso.

CURITIBA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

V697d Vilas Boas, Rogério Rodrigues
2016 Desenvolvimento e validação de método para quantificação de vancomicina em soro por CLAE-DAD e elaboração de protocolo de monitorização terapêutica em UTI neonatal / Rogério Rodrigues Vilas Boas.-- 2016.
130 f.: il.; 30 cm

Texto em português, com resumo em inglês.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Curitiba, 2016.

Bibliografia: f. 125-127.

1. Vancomicina. 2. Cromatografia a líquido de alta eficiência. 3. Medicamentos - Monitorização. 4. Validação de métodos. 5. Tratamento intensivo neonatal. 6. Engenharia biomédica - Dissertações. I. Schneider Junior, Bertoldo, orient. II. Cardoso, Marco André, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 610.28

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

Campus Curitiba



Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Título da Dissertação Nº 057

“Desenvolvimento e validação de método para a quantificação de vancomicina em soro humano por CLAE-DAD e elaboração de protocolo de monitorização terapêutica em UTI neonatal”.

por

Rogério Rodrigues Vilas Boas

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Engenharia Biomédica

LINHA DE PESQUISA: Instrumentação Biomédica

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS (M.Sc.)** – Área de Concentração: Engenharia Biomédica, pelo **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica (PPGEB)**, – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (**UTFPR**), *Campus Curitiba*, às **14h00min** do dia **31 de março de 2016**. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos professores:

Prof. Bertoldo Schneider Junior, Dr.
(Presidente – UTFPR)

Profª. Rosiane Guetter Mello Zibetti, Drª.
(FPP)

Profª. Flávia Lada Degaut, Drª.
(UFPR)

Visto da coordenação:

Profª. Leandra Ulbricht., Drª.
(Coordenadora do PPGEB)

AGRADECIMENTOS

Reverencio ao Professor Dr. Bertoldo Schneider Júnior pela sua orientação durante este trabalho e pela excepcional compreensão e auxílio ao longo desta jornada, que nunca me deixou desistir e sempre me motivou a continuar diante dos inúmeros desafios que surgiram. Tenho certeza de que sem a participação dele jamais poderia ter concluído tão árdua tarefa. E por meio dele, expresso a minha gratidão a toda a comunidade da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) que me acolheu durante este intenso período.

Agradeço ao Dr. Marco André Cardoso pela orientação desta pesquisa e pelo tempo em que se dedicou de forma altruística. À sua ajuda durante o dia a dia no laboratório para a construção deste trabalho, na pesquisa e na constante busca de soluções para os muitos desafios que surgiram e pelos momentos de aprendizado proporcionados como amigo e como professor ao longo da minha trajetória.

Exprimo minha gratidão à Ma. Marinei Campos Ricieri, ao Dr. Fábio de Araújo Motta pelo apoio e ideias sugeridas e as contribuições dos farmacêuticos e biomédicos residentes em Saúde da Criança e do Adolescente e a equipe do Núcleo de Pesquisa Clínica que juntos formaram a base sobre qual este trabalho foi desenvolvido.

Reconheço a contribuição das médicas Dra. Silmara Aparecida Possas e Dra. Carla Tiemi Minamihara e toda a equipe da UTI Neonatal do Hospital Pequeno Príncipe, aos pais que autorizaram a participação de seus filhos nesta pesquisa e a Associação Hospitalar de Proteção à Infância Dr. Raul Carneiro por todo o apoio fornecido.

Agradeço ao prof. Dr. Roberto Pontarolo e a equipe do Centro de Estudos em Biofarmácia da UFPR que cederam a infraestrutura, conhecimento e prestaram suporte e auxílio em tudo que foi necessário para a conclusão desta pesquisa.

Agradeço a toda equipe de professores e orientadores da Faculdade Pequeno Príncipe pela contribuição na minha formação profissional e como ser humano.

Agradeço aos pesquisadores e professores da banca examinadora pela atenção e contribuição dedicadas a este estudo.

Registro aqui também a minha gratidão especial aos meus queridos pais, Jaime Henrique Vilas Boas e Maria Odete Rodrigues e a minha amada esposa Ana Paula Filus Bandeira, pelo inesgotável apoio e compreensão durante esta longa jornada, sem os quais esta missão nunca poderia ter sido concluída.

RESUMO

VILAS BOAS, Rogério, R. **Desenvolvimento e validação de método para a quantificação de vancomicina em soro humano por CLAE-DAD e elaboração de protocolo de monitorização terapêutica em UTI neonatal.** 2016. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba 2016.

O monitoramento terapêutico da concentração de vancomicina é uma forma de melhorar a segurança e a eficiência no tratamento com este antibiótico. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é considerada padrão ouro para a quantificação desta droga. No entanto a análise exige que sejam realizados vários procedimentos de purificação e análise da amostra, o que reduz sua aplicabilidade ao uso clínico. Atualmente, não há consenso quanto aos níveis séricos adequados ao tratamento do neonato ou de como as doses devem ser ajustadas. Este trabalho propõe um protocolo de monitorização terapêutica da vancomicina e desenvolve e valida um método simplificado, de baixo custo e menor volume de amostra necessário para quantificação da concentração sérica da vancomicina através de CLAE com detecção por arranjo de diodos. As amostras foram extraídas por precipitação de proteínas com ácido trifluoroacético (ATF), o sobrenadante foi injetado diretamente no sistema cromatográfico. A fase móvel consistiu de ATF à concentração de 0,014% (pH 2.800) em água ultrapura e acetonitrila (92:8, v/v), sob fluxo de 2 mL/min por eluição em método isocrático e temperatura de 40°C. As respostas foram monitoradas no comprimento de onda de 230,9 nm. A validação foi conduzida de acordo com a resolução da RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA. O analito e o padrão interno (7-hidroxycumarina) foram eluídos em torno de 5.1 min e 10.3 min respectivamente. A linearidade do método foi determinada entre 2 e 70 mg/L com correlação linear de superior a 0.999. O método mostrou-se adequado a aplicação proposta, com vantagens volume de amostra exigido, o processo de extração simplificado e resultados satisfatórios com relação à precisão, exatidão, estabilidade e seletividade. O método de análise testado em 17 amostras reais de 10 pacientes com resultados satisfatórios. O protocolo de monitorização terapêutica foi adequadamente desenvolvido.

PALAVRAS CHAVE

<Vancomicina, Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE), Monitorização Terapêutica de Droga, Validação de Método Analítico>

ABSTRACT

VILAS BOAS, Rogério, R. **Validation and Development of a HPLC-DAD Method for Vancomycin Quantification in Human Serum and Development of a Therapeutic Drug Monitoring Protocol for Vancomycin in neonatal ICU.** 2016. 130 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

Therapeutic monitoring of vancomycin concentration can improve the safety and efficiency of the treatment with this antibiotic. High-performance liquid chromatography (HPLC) is considered gold standard for quantification for this drug. However the analysis requires multiple procedures for purification and analysis of the sample, which reduces their applicability for clinical use. There`s currently no consensus on vancomycin serum target levels and dose adjustment among newborns. This paper proposes a vancomycin therapeutic monitoring protocol and develops and validates a low cost, simplified method, with smaller sample volume requirement for serum concentration of vancomycin determination by using HPLC with diode array. Samples were extracted by protein precipitation with trifluoroacetic acid (TFA), supernatant was injected directly into the chromatographic system. Mobile phase consisted of TFA 0.014% (pH 2.800) in ultrapure water and acetonitrile (92:8, v /v) under flow rate of 2 mL / min eluting in isocratic method in 40oC. Response were monitored at a wavelength of 230.9 nm. Validation was conducted in accordance with the resolution of the RDC No. 27 of May 17, 2012 ANVISA. Vancomycin and internal standard (7-hydroxycoumarin) were eluted at approximately 5.1 min. and 10.3 min respectively. Linearity was assessed between 2 and 70 mg /L with linear correlation greater than 0.999. The method proved to be suitable for the proposed application, with the advantages of less sample volume required, simplified extraction and achieved satisfactory results of precision, accuracy, stability and selectivity. This method was tested in 17 real samples from 10 patients with satisfactory results. The drug monitoring protocol was successfully developed.

KEYWORDS

<Vancomycin, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Therapeutic Drug Monitoring, Method Validation>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura Química da Vancomicina	19
Figura 2 - Nível de Pico e Nível de Vale de Concentração Sérica	21
Figura 3 - Estabilidade de Concentração Sérica de Vancomicina	22
Figura 4 - Funcionamento Básico de um Sistema de CLAE	26
Figura 5 - Sistema Cromatográfico Agilent 1100	40
Figura 6 - Comparativo de cromatogramas entre a extração com ACN e ACN+HCL	55
Figura 7 - Extração da vancomicina com ATC 35%.	56
Figura 8 - Percentuais de recuperação da vancomicina empregando o método de precipitação proteica com ATC nas concentrações de 10 a 40%.	57
Figura 9 - Extração do analito com APC 30%	59
Figura 10 - Extração com do analito com ATF 30%	59
Figura 11 - Comparativo dos testes de extração da vancomicina em soro.	60
Figura 12 - Extração com ATF 85%, vancomicina a concentração de 70 µg/mL Vermelho: Analito em solução, Azul: Analito em matriz biológica.....	61
Figura 13 - Cromatograma obtido na Coluna C18 Zorbax 3.5 µm, 4.6x150mm.	62
Figura 14 - Cromatograma obtido na Coluna C18 X-Terra 3.5 µm. 4.6x150mm	62
Figura 15 - Cromatograma obtido na Coluna C18 X-Brigde 5 µm. 4.6x150 mm.	63
Figura 16 - Perfil Cromatográfico da utilizando-se como fase móvel Acetato de Sódio 75 mM 85% e 15% de ACN em coluna C18.....	64
Figura 17 - Perfil Cromatográfico da vancomicina em solução aquosa a concentração (20 mg/L).	65
Figura 18 - Cromatogramas obtidos com fase móvel composta de ATF.	65
Figura 19 - Estrutura Química Da 7-Hidroxycumarina.	66
Figura 20 - Cromatograma obtido a partir do teste de Seletividade em Soro Normal.	68
Figura 21 - Cromatograma obtido a partir do teste de Seletividade em Soro Hemolisado.....	68

Figura 22 - Cromatograma obtido a partir do teste de Seletividade em Soro Lipêmico.	69
Figura 23 - Gráfico da Linearidade da Vancomicina obtido pelo método desenvolvido.	71
Figura 24 - Cromatogramas representativos do Teste de Efeito residual.	74
Figura 25 - Fluxograma de realização do exame	79
Figura 26 - Plotagem de valores individuais de concentração mensurados. ...	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração Plasmática/Sérica de Vancomicina em Neonatos ...	25
Tabela 2 - Métodos de Análise de Vancomicina por CLAE (continua).....	28
Tabela 3 - Diluição do Analito	39
Tabela 4 - Condições Cromatográficas	45
Tabela 5 - Preparo da curva de calibração.....	47
Tabela 6 - Limite de Quantificação e Detecção do método desenvolvido.....	69
Tabela 7 - Valores de Precisão e Exatidão Interdia Obtidos em Cada Nível de Concentração da Curva de Calibração de Linearidade da Vancomicina	71
Tabela 8 - Variação do Fator de Matriz Normalizado por Padrão Interno (FMN) da Vancomicina Calculado para Avaliar o Efeito Matriz	73
Tabela 9 - Resultados dos Controles de Precisão e Exatidão	75
Tabela 10 - Ensaio de Estabilidade	76
Tabela 11 - Recomendações de ajuste de dose com base nos níveis de vancomicina	81
Tabela 12 - Doses recomendadas de vancomicina de acordo com o agente e a CIM	82
Tabela 13 - Resultados de Dosagem de Pacientes.....	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Ácido Perclórico
ASC24h	Área Sob a Curva em 24 horas
ATC	Ácido Tricloroacético
ATF	Ácido Trifluoroacético
CEB	Centro de Estudos em Biofarmacia
CC	Clearance de Creatinina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CQA	Controle de Qualidade de Alta Concentração
CQB	Controle de Qualidade de Baixa Concentração
CQD	Controle de Qualidade de Diluição
CQM	Controle de Qualidade de Média Concentração
CV%	Coeficiente de Variação Percentual
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
EM	Espectrometria de Massas
ER%	Erro Relativo Percentual
FL	Emissão de Fluorescência
FMN	Fator de Matriz Normalizado
HCL	Ácido Clorídrico
HEMEPAR	Hemoterapia do Paraná
HPP	Hospital Pequeno Príncipe
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de Detecção
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LSQ	Limite Superior de Quantificação
mAU	Milésimo de Unidade de Absorbância
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
N/A	Não se aplica
N/D	Não descrito
NB	Nível Sérico Basal de Vancomicina
NUPE	Núcleo de Pesquisa Clínica do Hospital Pequeno Príncipe
PI	Padrão Interno
PP	Protein Precipitation
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPM	Rotações por minuto.
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultra Violeta
VISA	<i>Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVO GERAL.....	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 VANCOMICINA	17
2.1.1 Resistência à Vancomicina.....	18
2.1.2 Características Físico-Químicas da Vancomicina	18
2.2 USO DA MONITORIZAÇÃO SÉRICA DA VANCOMICINA.....	19
2.3 O USO DA VANCOMICINA NO TRATAMENTO DE NEONATOS.....	23
2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	26
2.4.1 Métodos de Análise da Vancomicina por CLAE	27
2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS	30
2.5.1 Padrão Interno	30
2.5.1.1 Limite Inferior de Quantificação (LIQ) e Limite de Detecção (LD)	31
2.5.1.2 Controle de Qualidade de Baixa Concentração (CQB).....	31
2.5.1.3 Controle de Qualidade de Alta Concentração (CQA)	31
2.5.1.4 Controle de Qualidade de Média Concentração (CQM)	32
2.5.1.5 Limite Superior de Quantificação (LSQ).	32
2.5.1.6 Controle de Qualidade de Diluição (CQD)	32
2.5.2 Seletividade	32
2.5.3 Efeito Residual.....	33
2.5.4 Efeito Matriz	33
2.5.5 Curva de Calibração	34
2.5.6 Precisão.....	35
2.5.7 Exatidão.....	35
2.5.8 Estabilidade	36
2.5.9 Recuperação.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 REAGENTES E SOLVENTES.....	37
3.2 PADRÕES ANALÍTICOS.....	37
3.2.1 Vancomicina	37
3.2.2 7-OH-Cumarina	38
3.3 AMOSTRAS DE SORO HUMANO PARA VALIDAÇÃO.....	38
3.4 PREPARO DE SOLUÇÕES	38
3.5 EQUIPAMENTOS E CONSUMÍVEIS	39
3.6 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE.....	41
3.6.1 Extração do Analito.....	41
3.6.1.1 Extração com Acetonitrila e com Acetonitrila Acidificada com Ácido Clorídrico (HCl)	41
3.6.1.2 Extração com Ácido Tricloroacético.....	42
3.6.1.3 Extração com Ácido Perclórico	42
3.6.1.4 Extração com Acido Trifluoroacético.....	42
3.6.1.5 Ensaio de Recuperação.....	43
3.6.2 Preparo de Amostras	43
3.6.3 Coluna Cromatográfica.....	44
3.6.4 Otimização da Fase Móvel	44
3.6.5 Preparo da Fase Móvel Final.....	44
3.6.6 Otimização das condições cromatográficas	45
3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO	45
3.7.1 Curva de Calibração	46
3.7.1.1 Preparo da Curva de Calibração.....	46

3.7.2	Limites de detecção e quantificação.....	47
3.7.3	Seletividade	48
3.7.4	Efeito Residual.....	48
3.7.5	Efeito Matriz.....	49
3.7.6	Precisão e Exatidão.....	49
3.7.7	Estabilidade	49
3.7.7.1	Estabilidade das soluções de trabalho em bancada.....	50
3.7.7.2	Estabilidade da solução estoque	50
3.7.7.3	Estabilidade pós processamento	51
3.7.7.4	Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de longa e curta duração.....	51
3.8	ELABORAÇÃO DO PROTOCOLO DE MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA	52
3.9	AVALIAÇÃO DE PACIENTES	52
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.....	54
4.1.1	Extração do Analito.....	54
4.1.1.1	Extração com Acetonitrila	54
4.1.1.2	Extração com Ácido Tricloroacético.....	56
4.1.1.3	Extração com Ácido Perclórico e Ácido Trifluoroacético.....	58
4.1.1.4	Otimização da extração	60
4.1.2	Seleção da Coluna Cromatográfica.....	61
4.1.3	Fase móvel	63
4.1.4	Padrão Interno	66
4.1.5	Resumo das condições cromatográficas	67
4.2	VALIDAÇÃO	67
4.2.1	Seletividade	67
4.2.2	Limite de detecção e quantificação.....	69
4.2.3	Linearidade	70
4.2.4	Efeito Residual.....	72
4.2.5	Efeito Matriz.....	72
4.2.6	Precisão e Exatidão.....	75
4.2.7	Estabilidade	75
4.3	PROTOCOLO DE MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA	77
4.3.1	Indicação de Monitoramento	77
4.3.2	Fluxo de Amostras para Análise.....	78
4.3.3	Definição dos Níveis Terapêuticos de Vancomicina.....	79
4.3.4	Ajuste de Dose	81
4.4	AVALIAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE PACIENTES	82
4.5	PERSPECTIVAS E ESTUDOS FUTUROS	86
5.	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	88
	ANEXOS.....	98
	ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	98
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	98
	ANEXO B - ARTIGO ORIGINAL RELACIONADO A DISSERTAÇÃO.....	101
	ANEXO C - LAUDO DE ANÁLISE DO PADRÃO ANALÍTICO.....	128
	ANEXO D - PROTOCOLO HOSPITALAR DE MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DA VANCOMICINA.....	129

1. INTRODUÇÃO

A vancomicina é um antibiótico da família dos glicopeptídeos utilizado para o tratamento de infecções por bactérias gram positivas (JEHL *et al.* 1985). A vancomicina é a droga de escolha para tratamento de sepse e infecções sérias por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Staphylococcus epidermidis* (JACQZ-AINGRAIN *et al.* 2013; VALLE *et al.* 2008). É também indicada para o tratamento e profilaxia de infecções por outros agentes de interesse clínico como; *Clostridium difficile* (VENUGOPAL e JOHNSON, 2013), e as bactérias do gênero *Streptococcus* (HOOG; MOUTONI; ANKER, 2004).

A prescrição inadequada deste glicopeptídeo, especialmente a subdosagem, está associada ao desenvolvimento de cepas resistentes e ao aumento da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (KIM, *et al.* 2010). A falha na dosagem pode levar, ainda, a progressão da terapia com utilização de outras drogas de alto custo, como a linezolida, além do risco de nefrotoxicidade e ototoxicidade quando administradas elevadas concentrações de vancomicina (PRITCHARD *et al.* 2010; DE VRIESE; VANDERCASTEELE, 2014).

A vancomicina possui uma estreita faixa terapêutica e sua absorção apresenta grande variação entre os pacientes, pois depende da função renal, peso, idade e parâmetros metabólicos. A fim de obter a dose ideal, recomenda-se, além da adequação da dose empírica, o monitoramento da concentração sérica do fármaco e o subsequente ajuste da dose, caso necessário (RYBAK *et al.* 2009).

A dificuldade em se utilizar a vancomicina é ainda maior entre os neonatos. Devido à sua condição de recém nascido, associada aos processos patológicos a que estão sujeitos, bem como ao crescimento da sua massa corporal, apresentam variações em seu organismo como distribuição hídrica, função renal e de outros órgãos em processo de maturação que afetam a biodisponibilidade e dificultam estabelecer padrões seguros para dosagem e administração de drogas (HOOG; MOUTON; ANKER, 2004). Além disto alguns estudos apontam que a variabilidade farmacocinética da vancomicina entre os neonatos, não pode ser prevista apenas por peso, idade e *clearance* renal

(PACIFICI, ALLEGAERT, 2012). Num hospital terciário especializado em casos de alta complexidade, os pacientes apresentam uma série de patologias complexas que adicionam ainda mais barreiras ao tratamento e a otimização da terapia se faz necessária. Por estes motivos considera-se benéfico mensurar a concentração sérica da droga e assim avaliar se sua ação está adequada ou se são necessários ajustes de posologia ou troca do antibiótico (SANTOS *et al.* 2001).

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologia analítica através de cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD) para determinação de vancomicina sérica, aplicável à monitorização terapêutica em UTI neonatal.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver um método simples e rápido para determinação de vancomicina sérica por CLAE-DAD, aplicável ao uso em monitorização terapêutica em neonatologia.

Validar a metodologia conforme a legislação RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 e o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos FDA 2013.

Construir um fluxo para coletas de amostra e interpretação dos resultados para monitorização terapêutica em um hospital pediátrico.

Construir um protocolo para adequação do regime de dose com base na concentração sérica de vancomicina, em pacientes de UTI neonatal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VANCOMICINA

A vancomicina é, originalmente extraída de bactérias da ordem *actinomicetales* (*Nocardia lurida* e *Streptomyces orientales*), amplamente utilizada para tratamento de infecções por agentes gram positivos, tais como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, (JEHL *et al.* 1985, BRUNTON *et al.* 2007).

A vancomicina inibe a síntese da parede celular das bactérias susceptíveis, através de sua ligação firme à extremidade terminal D-Alanil-D-Alanina do pentapeptídeo peptidoglicano em crescimento. Essa ligação inibe a transglicosilase, entre as cadeias deste polímero. Em consequência, o peptidoglicano é enfraquecido, e a célula torna-se suscetível à lise. A membrana celular também é danificada, contribuindo para o efeito antibacteriano. (SATTUR *et al.* 2000, BRUNTON *et al.* 2007).

Introduzida em 1956, a vancomicina demonstrou forte atividade contra bactérias gram positivas, em especial *Staphylococcus aureus*. Devido a sua elevada toxicidade, foi substituída à medida que surgiram os novos beta-lactâmicos. Com o crescente aparecimento de cepas produtoras de beta-lactamase, a vancomicina voltou a ser a primeira opção para tratamento de infecções por *Staphylococcus sp.* (JACQZ-AINGRAIN *et al.* 2013).

Nos últimos 40 anos, a vancomicina têm sido o tratamento primário de escolha de infecções por MRSA tanto em adultos quanto em pediatria, sendo bem tolerada, de baixo custo e com resposta clínica bem estabelecida. No entanto, apresenta algumas limitações como lenta atividade bactericida, baixa penetração tecidual (em especial no tecido pulmonar) e potencial de toxicidade. (KIM, *et al.* 2010).

2.1.1 Resistência à Vancomicina

A resistência à vancomicina, com o aumento do seu uso, foi detectada em várias espécies de bactérias e entre elas destacam-se os enterococos resistentes à vancomicina e os *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (PALAZZO; ARAUJO; DARINI, 2004). Existem ainda os *S. aureus* que exibem uma redução de sua susceptibilidade a vancomicina exigindo doses mais altas da droga para o tratamento, os quais ficaram conhecidos como VISA (*Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*). As bactérias deste grupo apresentam um espessamento de sua parede celular, que contém mais terminações D-Alanil-D-Alanina. Estas bactérias podem compor subpopulações de cepas de *S. aureus* aparentemente sensíveis à vancomicina, tornando-se um desafio o seu diagnóstico (DE VRIESE; VANDECASTEELE, 2014).

A resistência à vancomicina nos enterococos deve-se a uma modificação do local de ligação D-Alanil-D-Alanina da unidade de formação do peptidoglicano, em que a D-Alanina terminal é substituída por D-lactato, o que resulta na perda de uma ligação de hidrogênio crítica, que facilita a ligação de alta afinidade da vancomicina a seu alvo, com a perda da atividade da mesma. Esse mecanismo também é observado em cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina que adquiriram os determinantes de resistência dos enterococos (KATZUNG, 2008).

2.1.2 Características Físico-Químicas da Vancomicina

A vancomicina (Figura 1) possui peso molecular de 1485.7 daltons, apresenta alta solubilidade em água, porém dependente do pH da solução. Em solução com água purificada permanece estável por mais de duas semanas em temperatura ambiente (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2015). Em solução a 5% apresenta pH que varia entre 2,5 e 4,5 (BERTOLUCI, 2007 *apud* MARTINDALE, 1999).

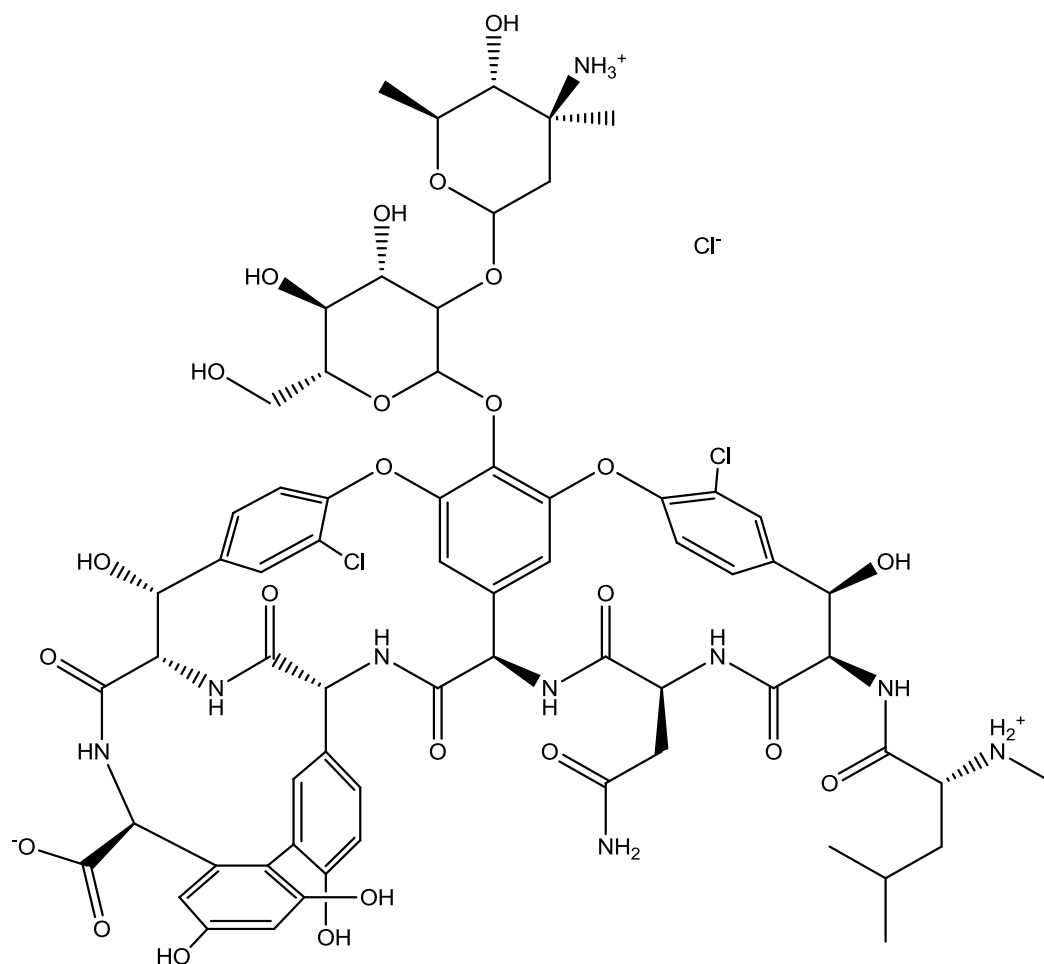


Figura 1 - Estrutura Química da Vancomicina

Dados: Fórmula Molecular: $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24} \cdot HCl$,

Nome IUPAC: (1S,2R,18R,19R,22S,25R,28R,40S)-48-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3-[[[(2S,4S,5S,6S)-4-amino-5-hidroxi-4,6-dimetiloxan-2-il]oxi]-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi]-22-(carbamoil metil)-5,47-dicloro-2,18,32,35,37-pentahidroxi-19-[(2R)-4-metil-2-(metilamino)pentanamido]-20,23,26,42,44-pentaoxo-7,13-dioxa-21,24,27,41,43-pentaazaociclo[26.14.2.2^{3,6}.2¹⁴.1⁷.1⁸.1².1²⁹.3³³.0¹⁰.2⁵.0³⁴.3⁹]]pentaconta-3,5,8,10,12(48),14,16,29(45),30,32,34,36,38,46,49-pentadecaeno-40-ácido carboxílico

Fonte: ChemDraw 12.0.2.1076 (2010).

2.2 USO DA MONITORIZAÇÃO SÉRICA DA VANCOMICINA

Apesar de ser uma droga consagrada no tratamento de MRSA, algumas cepas de *Staphylococcus spp.* têm demonstrado aumento na CIM tornando necessário o aumento das doses administradas (MCKAMY *et al.* 2011). A CIM da vancomicina contra *S. epidermidis* e *S. aureus* varia, em geral, de 0,5 a 2

mg/L devendo a concentração no sangue ser superior a 4 mg/L, devido a sua taxa de ligação plasmática (50%) (TAN *et al.* 2002).

O melhor preditor do sucesso do tratamento de MRSA com vancomicina, segundo alguns autores, é a razão entre a área sob a curva da concentração sanguínea de vancomicina pelo tempo em 24 horas (ASC_{24h}) dividida pela CIM do microorganismo (mg/L) cujo resultado, quando acima de 400, é associado ao sucesso do tratamento (MOISE-BRODER *et al.* 2004; TAN *et al.* 2002). Em outras palavras, a concentração sérica/plasmática estimada da droga durante o período de tratamento em relação ao grau de susceptibilidade do MRSA. Desta forma, o cálculo da CIM é um dado importante para o ajuste da dose.

Em casos onde a CIM é superior a 1 mg/L, torna-se muito difícil atingir este alvo terapêutico, fazendo-se necessário o aumento de doses ou troca por outras drogas (JACQZ-AINGRAIN *et al.* 2013). Nos MRSA com CIM acima de 2 mg/L a vancomicina torna-se obsoleta para o tratamento.

Segundo HOLMES *et al.* (2013) o cálculo da ASC_{24h} é dado pela fórmula:

Equação 1:

$$ASC_{24h} = \frac{\text{Dose total de vancomicina em 24 horas (mg)}}{\{[(\text{Clearance de Creatinina} \times 0.79) + 15.4] \times 0.06\}}$$

No entanto, o cálculo realizado desta forma leva em conta apenas a dose total administrada em 24 horas, e não leva em conta diferenças no regime de administração e outros fatores que podem interferir na biodisponibilidade da droga, o que pode ser melhor estimado pela aferição do nível basal de vancomicina. A realização do estudo da ASC_{24h}/CIM , somado a mensuração dos níveis sanguíneos da droga é sugerida como uma forma relevante de prever o sucesso da terapia com vancomicina (HOLMES *et al.* 2013).

A literatura relata casos específicos, como dos pacientes com queimaduras graves, em que foi realizado estudo das ASC_{24h}/CIM e a dosagem de níveis basais para embasar a prática, já que existe dificuldade em fornecer doses adequadas a estes pacientes (GOMEZ *et al.* 2013).

A dosagem do nível de vancomicina no plasma ou soro tem sido utilizada desde o início dos anos 1980 como forma de evitar os efeitos indesejados da droga como nefrotoxicidade e ototoxicidade (JEHL *et al.* 1985). Esta metodologia tornou-se consagrada para esta finalidade e, atualmente é utilizada por vários estabelecimentos de assistência a saúde no Brasil e internacionalmente.

O controle do nível sérico/plasmático da vancomicina costumava ser realizado em dois momentos (Figura 2); logo após o término da infusão (“*peak level*” ou nível de pico) e imediatamente antes da próxima infusão, no final do tempo de meia vida da droga, conhecido por “*trough level*”, nível de vale ou nível basal (NB). Estudos subsequentes questionaram a utilidade do nível de pico e mostraram que o NB apresentava melhor valor preditivo na detecção de níveis tóxicos e subterapêuticos (TAN *et al.* 2002), este processo é em parte explicado pela maior velocidade de depuração da droga quando a concentração é mais alta (BRUNTON *et al.* 2007).

O NB é o ponto onde a droga apresenta sua concentração mais baixa e, caso a concentração da droga em circulação esteja abaixo do recomendado neste momento, pode representar perda de eficácia do tratamento. Da mesma forma, se o NB estiver muito elevado, pode indicar maior risco de efeitos tóxicos associados ao fármaco (BEGG *et al.* 1999).

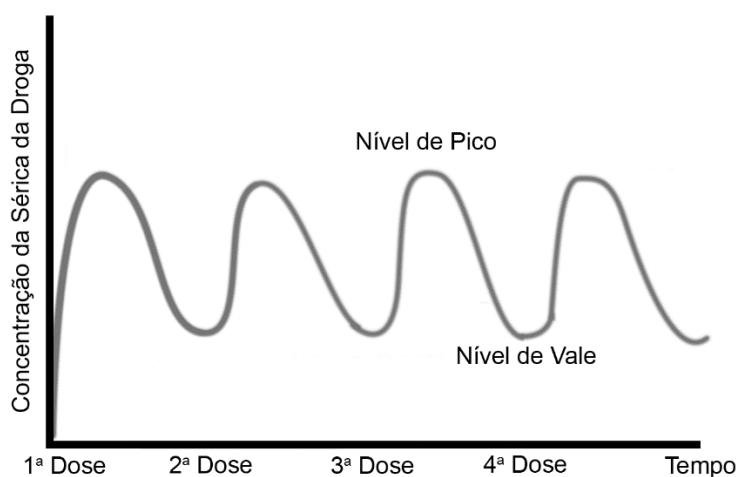


Figura 2 - Nível de Pico e Nível de Vale de Concentração Sérica
Fonte: Adptado de: GARNER, 2013

A coleta do exame para a monitorização terapêutica da vancomicina deve ser realizada após um período de uso da droga, para que a concentração

da mesma atinja a estabilidade de concentração, estado de equilíbrio ou “*steady state*” (Figura 3). O estado de equilíbrio da concentração está relacionado a taxa de depuração da droga e a taxas de distribuição nos tecidos, que sofrem constante alteração ao longo da terapia, quando são aplicadas doses intermitentes. O estado de equilíbrio é atingido quando taxa de eliminação e a taxa de absorção do fármaco são iguais (BRUNTON *et al.* 2008). No caso da vancomicina, a variação na concentração o sanguínea é maior no início do tratamento e, após administradas 3 doses, esta variação diminui e permite uma estimativa mais confiável do valor da mesma (HOANG *et al.* 2014). Segundo BRUNTON *et al.* (2008), o tempo de meia vida farmacológico da vancomicina é de $5,6 \pm 1,8$ horas, sendo a excreção majoritariamente urinária (79%) e proporcional a taxa de *clearance* renal e a taxa de ligação plasmática é de 30%.

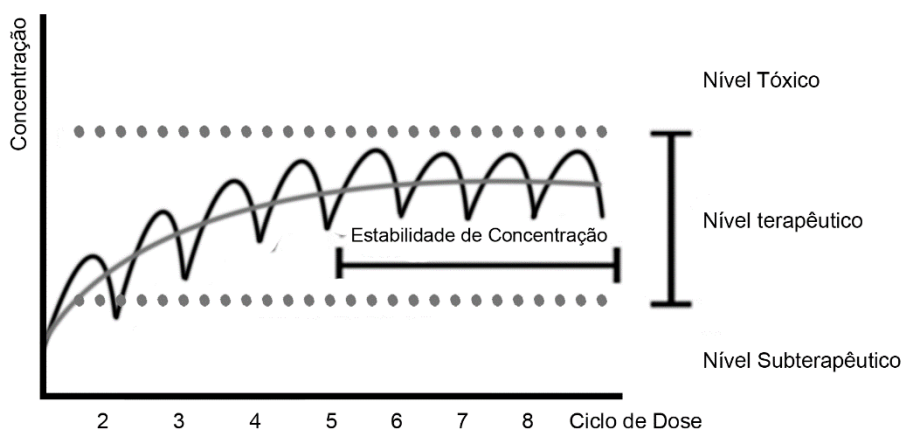


Figura 3 - Estabilidade de Concentração Sérica de Vancomicina
Fonte: Adaptado de KIM, 2008.

A terapia com níveis subterapêuticos de vancomicina pode estar relacionada com o aparecimento de cepas resistentes e aumento no tempo de tratamento (JACQZ-AINGRAIN *et al.* 2013).

O aumento da concentração sérica da droga e do tempo de tratamento são fatores predisponentes à ocorrência de nefro e ototoxicidade associada ao uso da vancomicina (HAZLEWOOD *et al.* 2010). A nefrotoxicidade está relacionada com nível sérico ou plasmático basal elevado e não há consenso quanto ao valor dos níveis de pico na predição de toxicidade (MCKAMY *et al.*

2011). O mecanismo exato pelo qual a vancomicina causa toxicidade renal é ainda desconhecido, porém sabe-se que é mediada por efeito citotóxico nas microvilosidades epiteliais (JACQZ-AINGRAIN *et al.* 2013).

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) recomenda monitorar a concentração sérica para reduzir os riscos de toxicidade renal associados ao uso da vancomicina (RYBAK *et al.* 2009).

Os métodos de análise da concentração de vancomicina em plasma ou soro relatados são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), imunofluorescência polarizada, radioimunensaio, ensaio imunoenzimático múltiplo e ensaio microbiológico (SANTOS *et al.* 2001). A CLAE tem se mostrado uma técnica confiável, com alta reprodutibilidade (JEHL, *et al.* 1985; DIANA *et al.* 2003; FEFERBAUM *et al.* 2001) e é considerada padrão ouro para a quantificação desta droga (TRUJILLO, 1999).

2.3 O USO DA VANCOMICINA NO TRATAMENTO DE NEONATOS

A vancomicina é frequentemente utilizada para tratar infecções em neonatos devido à MRSA sendo, primariamente, administrada em doses intermitentes. Porém, as recomendações de dosagem variam de um centro para outro (JACQZ-AINGRAIN *et al.* 2013). Não há um consenso quanto às doses e níveis séricos de vancomicina a serem considerados no tratamento de neonatos. Estima-se que mais de 90% dos medicamentos usados em UTI neonatal são utilizados em regime *off-label* ou não autorizado (CONROY; MCINTYREI, 2005).

Desta forma, monitorar a concentração sérica da vancomicina é importante em recém-nascidos de termo e pré-termo, já que estes pacientes apresentam mudanças rápidas e intermitentes em distribuição hídrica e função renal que interferem na distribuição, metabolismo e depuração da droga (SANTOS *et al.* 2001; ANDERSON *et al.* 2007).

No entanto, existem controvérsias a respeito de qual seria o nível plasmático ideal para o uso da vancomicina, especialmente na população pediátrica. O último consenso da sociedade americana de doenças infecciosas

sugere que o nível seja mantido acima de 10 mg/L para reduzir o risco do desenvolvimento de resistência microbiana (RYBAK *et al.* 2009). Além disso, sugere também que para infecções mais graves tais como bacteremia, endocardite infecciosa, osteomielite, meningite, pneumonia e fascite necrosante devem ser considerados níveis séricos de 15 a 20 mg/L, embora ainda existam poucos estudos em crianças (RYBAK *et al.* 2009; LIU *et al.* 2009).

Esta orientação, porém, é questionada por vários autores, segundo os quais o nível basal de 15 mg/L já incorre em risco aumentado de nefrotoxicidade (PRITCHARD, *et al.* 2010; MCKAMY *et al.* 2011). Já foram demonstrados resultados satisfatórios no tratamento com alvo terapêutico de nível basal 7 a 10 mg/L na concentração sanguínea e, nos trabalhos mais antigos, predomina o uso do nível basal de 5 a 10 mg/L. Porém, devido à progressiva elevação das CIMs, têm-se levantado questões sobre a validade deste nível na efetividade dos tratamentos (FRYMOER; GUGLIELMO; HERSH, 2013). A Tabela 1 demonstra os níveis basais relatados na literatura e em protocolos hospitalares consultados para a realização deste trabalho, bem como a sugestão de ajustes posológicos.

Entre artigos, protocolos de conduta e *guidelines* ainda não existe consenso quanto aos níveis mais adequados na população neonatal. Somando todos os estudos levantados, a faixa de concentração recomendada variou de 5 mg/L até 20 mg/L, que podem ser consideradas como linhas de corte entre subdose e sobredose para o NB.

Tabela 1 - Concentração Plasmática/Sérica de Vancomicina em Neonatos

Referência	Nível Basal Adequado	Ajuste Posológico
Ong e Nicolau, 2004	5 - 15 mg/L	Não definiu conduta.
Hoog, Mouton e Anker 2004	5 - 10 mg/L	Não definiu conduta.
Rocha, Almeida e Falcão 2006	6 - 10 mg/L	Não definiu conduta.
Rybak <i>et al.</i> 2009	Acima de 10 mg/L	Não definiu conduta
Obs. Consenso da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA)	15 a 20 mg/L para CIM entre 1 e 2 mg/L e infecções de maior gravidade.	
RQHR - Neonatal: Dosing Regimen and Monitoring Protocol. Canada, 2009	5 - 12 mg/L Até 15 mg/L para infecção do Sistema Nervoso Central.	NB < 5 mg/L - reduzir intervalo de dose NB > 12mg/L - aumentar intervalo de dose Obs. Protocolo Hospitalar
Kim <i>et al.</i> 2010	5 - 10 mg/L	Não definiu conduta.
McKamy <i>et al.</i> 2011	5 -15 mg/L	Não definiu conduta.
Oudin et al, 2011	10 - 30 mg/L	Não definiu conduta.
FEHMIG - Protocolo de Sepse Neonatal. Minas Gerais, 2012	5 - 10 mg/L	NB < 5 mg/L - reduzir intervalo de dose. NB > 10 mg/L - aumentar intervalo ou reduzir a dose. Obs. Protocolo Hospitalar Apenas tratamento de sepse
Hospital Israelita Albert Einstein, 2012	10 - 20 mg/L	<10 mg/L -> Reduzir o intervalo de dose >20 mg/L - Reduzir a dose e manter o intervalo de dose
Young, 2012	5 - 10 mg/L / 10-20 mg/L	Não definiu conduta.
Jacqz-Aigrain, <i>et al.</i> 2013	10-15 mg/L 15-20 mg/L para MRSA com CIM elevado.	Não definiu conduta.
Frymoer, Guglielmo e Hersh, 2013	7 - 10 mg/L	Não definiu conduta.
Saugel <i>et al.</i> 2013	5 - 10 mg/L	Não definiu conduta.
Lavoie <i>et al.</i> 2013	5 - 10 mg/L	Não definiu conduta.
Gomez <i>et al.</i> 2013	10 - 20 mg/L	Não definiu conduta.

NB = Nível basal de vancomicina mensurado.

2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência é um método de separação de analitos em uma mistura. O método requer uma coluna composta de fase estacionária com pequenas partículas e de uma fase móvel que é empurrada por alta pressão através do sistema. (MEYER,2004). O soluto é transportado pela coluna separando os componentes da amostra conforme as interações entre os constituintes da amostra e os da coluna cromatográfica e fase móvel (POOLE, 2003).

Diversos princípios de separação podem ser utilizados na cromatografia líquida, baseado no tamanho das partículas, afinidade bioquímica com a fase estacionária, pareamento iônico, entre outros (POOLE, 2003). Uma forma eficaz de obter a separação de compostos é utilizar a cromatografia de fase reversa, separando os componentes de acordo com a sua polaridade. Neste método a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar, os componentes apolares (lipofílicos) são eluidos posteriormente aos componentes polares (hidrofílicos) (MEYER, 2004).

O esquema básico de funcionamento da CLAE está demonstrado na Figura 4 e inclui um reservatório de solvente, uma bomba para gerar as altas pressões, um sistema de injeção de amostra, uma coluna para separação dos componentes da mistura e um sistema de detecção (MEYER, 2004).

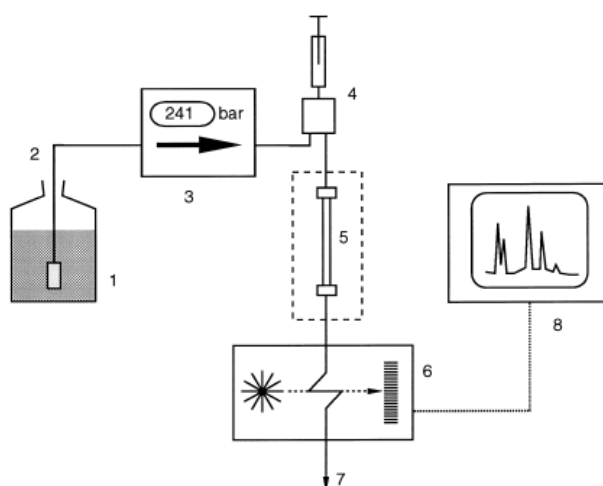


Figura 4 - Funcionamento Básico de um Sistema de CLAE

1 - Reservatório do solvente, 2 - Tubulação, 3 - Bomba, 4 - Injetor, 5 - Coluna, 6 - Detector, 7 - Descarte, 8 - Sistema de Análise.

Fonte: MEYER, 2004

Uma etapa importante da CLAE é o sistema de detecção, no qual os componentes separados pela coluna têm que ser caracterizados e quantificados. A escolha do método de detecção depende do tipo de analito a ser avaliado e o nível de sensibilidade requerido pela análise. Os sistemas de detecção são variados. Entre eles destacam-se a medida da absorção de luz ultravioleta através de espectrofotômetro (UV) ou arranjo de diodos (DAD) esse último permitindo avaliar múltiplos comprimentos de onda simultaneamente. Outras formas de detector incluem a emissão de fluorescência (FL) e a espectrometria de massas (EM) (POOLE, 2003).

2.4.1 Métodos de Análise da Vancomicina por CLAE

Foram identificados quase 30 diferentes métodos de análise da vancomicina através de CLAE em diferentes matrizes biológicas (soro, plasma, urina, líquido, líquido peritoneal, humor vítreo, entre outros). Os métodos de detecção mais utilizados são sistemas de EM, UV e DAD (Tabela 2). A faixa de quantificação dos métodos variou de 0,1 até 250 mg/L (JESÚS VALLE *et al.* 2008). Diversas configurações de extração e composição de fase móvel foram descritas (Tabela 2). As técnicas de extração de analito relatadas em literatura envolveram precipitação de proteínas com uma série de reagentes como acetonitrila (SANTOS *et al.* 2001), metanol (FAVETTA, 2001), ácido perclórico (LUKSA, 1995), ácido tricloroacético (CHENG, 2010) e ácido trifluoroacético (SHIBATA, 2003). Após a precipitação das proteínas alguns autores seguiram com processos adicionais sobre a amostra como filtração (JEHL, 1985), concentração através de evaporação em fluxo de nitrogênio (BERTOLUCI, 2007; VERA LÓPEZ 2007; SANTOS *et al.* 2001, AHSMAN *et al.* 2009; SHEN 2008; ABU-SHANDI, 2009; HU, 2012; HAGIHARA 2013), diluição (FAVETTA, 2001), e extração em fase sólida (BARANOWSKA *et al.* 2010).

Tabela 2 - Métodos de Análise de Vancomicina por CLAE (continua)

Matriz	Técnica de extração	Reagente de Extração	Técnica analítica	Fase móvel	Fluxo (mL /min)	Coluna	Vol. Amostra (uL)	Linearidade	Referência
Líquor, Soro e Fluido Peritoneal.	PP + filtração	ACN/isopropanol	CLAE + UV	ACN, Acetato de amônia, e H ₂ O (pH5.4)	1	Ultrasphere, C18 5um	500	1-50 mg/L	Jehl <i>et al</i> 1985
Solução	N/A	N/A	CLAE+UV	Trietilamina/Tetraidrofurano/ACN (gradiente)	1.5	Ultrasphere-ODS 5 um	?	0.08-0.8/ 2-20 mg/L	Inman, 1987
Plasma	PP	ACN	CLAE + UV	ACN/Fosfato (pH 2.5)	1.5	Shin-pack CLC-NH ₂ (5um)	100	0.1-10/ 10-100 mg/L	Hosotsubo, 1989
Plasma	PP	Ácido Perclórico	CLAE-UV	KH ₂ PO ₄ /ACN	1	Nucleosil RP18 (150x4.6mm, 5um)	1000	1-100 mg/L	Luksa <i>et al</i> 1995
Plasma	PP + Diluição	Metanol	CLAE + EMIT	ACN/Na ₂ HPO ₄ (12:88 v/v)	0.8	Kromasil C18 5um	100	5-100 mg/L	Favetta, <i>et al</i> 2001
Plasma	PP + Evaporação	ACN	CLAE-UV	Fosfato 0.05 mol/L, pH4.7, metanol;ACN (80:15:5 v/v)	0.8	C18 SHIMADZU 150x6mm	250	1-200 mg/L	Santos <i>et al.</i> 2001
Plasma de rato	PP	ATF-metanol	CLAE EM	ACN/H ₂ O (1:9, v/v)	0.2	Inertsil ODS-3 100x2.1mm	100	0.01-20 mg/L	Shibata, <i>et al</i> 2003
Urina	PP	ACN+Metanol	CLAE-DAD + FL	Metanol/ACN/H ₂ O+ATF 0.05% (gradiente)	0.6-0.75	Purosphere C18 (125x3mm) + LiChrospher C18 (4x4mm)	750	0.25-25 mg/L	Baranowska, <i>et al.</i> 2006
Plasma	PP + Evaporação	CAN	CLAE-UV	Acetato de sódio 0.075M pH 5.0, ACN (92:8; v/v)	0.8	Sulpelcosil LC18 (250 x 4.6mm, 5 µm)	200	1.5-100 mg/L	Bertoluci, 2007
Plasma	PP + Evaporação	CAN	CLAE-UV	Acetato de sódio 0.075M pH 5.0, ACN (92:8; v/v)	0.8	Sulpelcosil LC18 (250 x 4.6mm, 5 µm)	300	0.4-100 mg/L	Vera López <i>et al.</i> 2007

Tabela 2 - Métodos de Análise de Vancomicina por CLAE (conclusão)

Matriz	Técnica de extração	Reagente de Extração	Técnica analítica	Fase móvel	Fluxo (mL/min)	Coluna	Vol. Amostra (uL)	Linearidade	Referência
Plasma de Rato	PP + Evaporação	ACN+HCL	CLAE EM	ACN/Ácido fórmico 1% (gradiente)	N/D	SeQuant Zic-HILIC 50 X 2.0 mm, 5 µm	25	N/D	Shen <i>et al</i> 2008
Fluido de perfusão e tecido pulmonar	PP	ATC/APC	CLAE - UV	NH ₄ H ₂ PO ₄ /ACN (92.8 v/v)	1-1.5	Nucleosil, 120 C18 15x04cm, 5 µm	1000	0.1-2/2-15/15-250 mg/L	Valle, <i>et al</i> 2008
Plasma	PP + Evaporação	ACN	CLAE + FL	Metanol/Fosfato monopotássico pH 6.3	1	Waters µBondapak C18 300x4mm	500	5-1,000 ng/mL	Abu-Shandi, <i>et al</i> 2009
Plasma	PP + Evaporação	ACN	CLAE-EM	H ₂ O/Metanol + ácido fórmico (gradiente)	1-2	UPLC BEH C18 2.1x100mm	50	0.7-70 mg/L	Ahsman <i>et al.</i> 2009
Plasma e Urina	Extração em fase sólida	N/A	CLUE + UV	ACN/Ácido Fórmico 0.1%	N/D	Hypersil GOLD C18 (50 x 2.1 mm, 1.7 µm)	1000	0.36-20 mg/L	Baranowska <i>et al.</i> 2010
Plasma de rato	PP	ATC	CLAE EM	ACN/H ₂ O + 0.1% de ácido fórmico (gradiente)	0.25	Phenomenex C18 5µ, 50x2mm	50	1 -5000 ng/mL	Cheng, <i>et al</i> 2010
Plasma	PP + Evaporação	Acetato de Etila	CLAE+DAD	Metanol; fosfato de sódio hidrogenado (40/60 v/v %)	1	Zorbax XDB-C8 5 µm	2000	N/D	Hu, <i>et al</i> 2012
Plasma humano, Soro de rato e lavado broncoalveolar	PP + Evaporação	ACN	CLAE +UV	ACN/Fosfato de Amônio	1.2	Spherisorb C18 5µm	200	1 - 80 mg/L	Hagihara, <i>et al</i> 2013
Plasma	PP	ACN	CLUE EM	Ácido Fórmico 0,1% em água e Ácido Fórmico 0.3% em ACN	0.3	Phenomenex C18 2.1x50mm (2.6µm)	100	0.5-100 mg/L	Tsai <i>et al.</i> 2013

Siglas: PP: Precipitação de Proteínas, ACN: Acetonitrila, CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, CLUE: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, EM: Espectrometria de Massas, UV: Detecção por luz ultravioleta, N/A: Não se Aplica, N/D: Não descrito, DAD: Detecção por Arranjo de Diodos, FL: Fluorescência, EMIT: Ensaio Imunoenzimático, ATF: Ácido Trifluoroacético, ATC: Ácido Tricloroacético. Fonte: Autoria Própria

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

A validação do método consiste em uma série de avaliações para assegurar a confiabilidade nos dados obtidos através do mesmo. Por meio dos testes de validação é estabelecido o conjunto de características de desempenho do método e estes devem satisfazer os requisitos para a aplicação pretendida (USP, 2009).

De acordo com a resolução da RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA, que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos, é exigida a análise de um conjunto de parâmetros através de ensaios de validação. Os parâmetros exigidos são: seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração (linearidade), precisão, exatidão sensibilidade (limite inferior e superior de quantificação, limite de detecção) e estabilidade do analito e padrão interno (BRASIL, 2012).

2.5.1 Padrão Interno

O padrão interno é uma substância química proveniente de uma solução padrão de concentração fixa, adicionada em uma mesma quantidade aos padrões de calibração, amostras de controle de qualidade e amostras de estudo (BRASIL, 2012).

A substância utilizada como padrão interno idealmente deve possuir um tempo de retenção próximo ao do analito, não reagir com o analito, não fazer parte da amostra e ficar separada dos componentes da matriz (RIBANI *et al.* 2004).

Amostras de Controle de Qualidade

Os ensaios de validação são realizados através da análise de amostras de controle de qualidade. Consistem em amostras de matriz na qual é adicionada uma concentração específica da substância a ser analisada e padrão interno (PI). Ao longo dos ensaios de validação são utilizadas 6 concentrações de controle de qualidade de acordo com a legislação e estes são descritos a seguir. (BRASIL, 2012).

2.5.1.1 Limite Inferior de Quantificação (LIQ) e Limite de Detecção (LD)

O LIQ corresponde à concentração mínima que o método é capaz de mensurar. Para os métodos cromatográficos considera-se o LIQ como a menor concentração na qual se obtém relação sinal/ruído superior a 10. No caso do LD, a menor concentração na qual a relação sinal/ruído é superior a 3 (BRASIL, 2012).

2.5.1.2 Controle de Qualidade de Baixa Concentração (CQB)

O CQB é preparado com concentração equivalente a até 3 vezes o LIQ (BRASIL, 2012).

2.5.1.3 Controle de Qualidade de Alta Concentração (CQA)

O CQA é preparado com concentração entre 75 e 85% do Limite Superior de Quantificação (LSQ) do método (BRASIL, 2012).

2.5.1.4 Controle de Qualidade de Média Concentração (CQM)

O CQM é composto da matriz adicionada do analito em uma concentração próxima entre a média dos limites superior e inferior de quantificação do método (BRASIL, 2012).

2.5.1.5 Limite Superior de Quantificação (LSQ).

O LSQ é a maior concentração na curva de calibração do método (BRASIL, 2012).

2.5.1.6 Controle de Qualidade de Diluição (CQD)

Amostra adicionada com analito acima da concentração do LSQ, analisada por procedimento pré-estabelecido de diluição (BRASIL, 2012).

2.5.2 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito e o PI na presença de outros componentes da amostra. Para o ensaio de seletividade é necessário comparar a matriz biológica de diferentes fontes para investigar interferentes que possam afetar a seletividade do método. Conforme a aplicação do método deve se testar também amostras lipêmicas (com alto teor de lipídeos) e hemolisadas (contendo hemácias lisadas) (BRASIL, 2003; BRASIL 2010, U.S, 2013),

Aplica-se no ensaio de seletividade testes em que o analito na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ) e o PI são mensurados e

seu perfil cromatográfico é comparado aos perfis das diferentes matrizes biológicas. As respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras do LIQ. Da mesma forma a resposta dos interferentes próximos ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5%. Caso estes resultados não possam ser obtidos deve-se alterar o método de forma a garantir a seletividade e testar novamente com novas amostras de fontes distintas (BRASIL, 2012).

2.5.3 Efeito Residual

O efeito residual, ou *carryover*, é o efeito gerado por aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI proveniente de contaminação de amostras anteriores. Para que o efeito residual seja testado é necessário que sejam injetadas consecutivamente, uma amostra em branco, uma amostra contendo o analito na concentração do LSQ e o PI, e depois mais duas amostras em branco (BRASIL, 2012).

Para fins de validação compara-se o perfil cromatográfico antes e depois da passagem do analito e PI. As respostas no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito em LIQ e inferiores a 5% da resposta do PI (BRASIL, 2012).

2.5.4 Efeito Matriz

O efeito causado por componentes da matriz biológica na resposta do analito ou PI é denominado efeito matriz, e é necessário realizar um ensaio específico para sua avaliação. São comparadas amostras em concentração de concentração de quantificação baixa (CQB) e concentração de quantificação alta (CQA), em solução e em matriz biológica normal, lipêmica e hemolisada. Para cada amostra deve ser obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN).

O coeficiente de variação (CV) dos FMN deve ser inferior a 15%. O FMN é dado pela seguinte equação (BRASIL, 2012):

Equação 2:

$$\text{FMN} = \frac{(\text{Resposta do Analito em matriz/Resposta do PI em matriz})}{(\text{Resposta do Analito em solução/Resposta do PI em solução})}$$

Em casos em que os CV% dos FMN sejam superiores a 15% devido ao resultado de amostras hemolisadas, calcula-se um novo coeficiente de variação após exclusão das amostras hemolisadas, as quais não poderão ser analisadas por este método (BRASIL, 2012).

2.5.5 Curva de Calibração

A curva de calibração é a relação dada entre a resposta do instrumento analítico e a concentração conhecida do analito. Para obter a curva de concentração é necessário utilizar a mesma matriz proposta para o estudo e adicionar a esta o analito e o padrão interno. A matriz fortificada com diferentes concentrações do analito e concentração constante de PI passa por todo o processo de preparação ao qual a amostra deve ser submetida (BRASIL, 2012).

As respostas do instrumento são relacionadas através de modelo matemático, preferencialmente o modelo linear (linearidade). Segundo a legislação, a curva deve contar com no mínimo 6 amostras de diferentes concentrações. Aprova-se uma variação de no máximo 20% em relação a concentração nominal para padrões de LIQ e 15% para as outras concentrações. No mínimo 75% dos padrões de calibração devem ser aprovados por estes critérios e no mínimo 6 padrões de concentrações diferentes devem ser aprovados incluindo LIQ e LSQ (BRASIL, 2012). O coeficiente de correlação linear R^2 da curva deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003).

2.5.6 Precisão

A precisão denota a proximidade entre os resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte, relata a dispersão dos resultados obtidos. Para validar um método bioanalítico é necessário determinar a precisão em uma mesma corrida (intracorrída) e a precisão entre 3 corridas diferentes realizadas em dias distintos (intercorrída). Segundo a norma, em cada corrida são analisadas 5 replicatas nas concentrações de LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. A precisão é expressa como desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV%), o qual não deve ser superior a 20% para o LIQ e 15% para as demais concentrações. O CV% é obtido pela seguinte equação (BRASIL, 2012):

Equação 3:

$$CV\% = \text{Desvio Padrão} \times 100 / \text{Concentração média experimental}$$

2.5.7 Exatidão

A exatidão se refere à proximidade dos resultados obtidos pela análise em relação ao valor de referência esperado. O ensaio para validar a exatidão do método exige que sejam realizadas pelo menos 3 corridas em dias distintos, com pelo menos 5 replicatas de pelo menos 5 concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. A exatidão deve ser avaliada em uma mesma corrida com uma mesma curva de calibração (intracorrída) e em 3 corridas cada uma comparada a uma curva de calibração diferente e soluções novas preparadas (intercorrídas) (BRASIL, 2012).

A medida da exatidão é expressa pelo Erro Relativo Percentual (ER%), o qual não deve ser superior a 15% em relação à concentração nominal, exceto às amostras de LIQ, na qual o ER% não deve ser superior a 20% da concentração nominal. O ER% é obtido pela seguinte fórmula (BRASIL, 2012):

Equação 4:

$$\text{ER\%} = \frac{((\text{Concentração média experimental} - \text{Concentração nominal}) \times 100)}{\text{Concentração nominal}}$$

2.5.8 Estabilidade

A estabilidade refere-se à manutenção da concentração do analito dentro de limites estabelecidos, sob condições específicas. Relaciona-se com a possível degradação do analito nas condições de ensaio (BRASIL, 2012).

Para os estudos de estabilidade são empregadas no mínimo três amostras nas concentrações de CQB e CQA e adicionadas de PI. Admitem-se variações de até 15% da média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal (BRASIL, 2012).

A estabilidade é definida em diferentes condições: estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade do analito em curta duração, longa duração e estabilidade pós-processamento (BRASIL, 2012).

2.5.9 Recuperação

A recuperação denota a eficiência de extração do método, expressa em percentual da concentração conhecida, compara-se a resposta analítica do branco acrescido de padrão após a extração e a resposta analítica das soluções padrão sem passar pela extração. O ideal é que a recuperação seja próxima de 100%, porém são admitidos valores menores desde que a resposta analítica seja precisa e exata (BRASIL, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi composto de duas etapas principais, o desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE, seguindo as recomendações da RDC n. 27, de 17 de maio de 2012 e o desenvolvimento do protocolo clínico para uso hospitalar da monitoração sérica da vancomicina. Os experimentos foram realizados no Centro de Estudos em Biofarmácia (CEB) na Universidade Federal do Paraná (UFPR), a construção do protocolo foi realizada com a colaboração do corpo clínico do Hospital Pequeno Príncipe (HPP).

3.1 REAGENTES E SOLVENTES

Em todos os testes foram utilizados reagentes e solventes de padrão analítico. Água ultrapura obtida através do sistema Milli-Q (Millipore, Milford, EUA). Acetonitrila grau CLAE (Tédia Fairfield, EUA), Ácido trifluoroacético grau CLAE (TediaBrasil Rio de Janeiro, Brasil), Ácido tricloroacético (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Brasil), ácido clorídrico (36-38% v/v) (Mallinckrodt Baker, Edo. de Mexico, México), ácido perclórico (VETEC, Brasil), Acetato de sódio (Sigma-Aldrich, China), e Fosfato de sódio monobásico (Casa da Química, Brasil).

3.2 PADRÕES ANALÍTICOS

3.2.1 Vancomicina

O padrão analítico de vancomicina utilizado na condução dos estudos e da validação foi o Cloridrato de Vancomicina do fabricante: Sigma-Aldrich, St.

Louis, EUA), número CAS: 1223409-00-7, $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$. HCl x H_2O . Massa molecular: 1485.71 (base anidra), forma física pó, solúvel em água até 50mg/mL, teor > 95%, Temperatura de armazenagem 2 - 8 °C, valido até 24/05/2019, segundo laudo analítico do fabricante.

3.2.2 7-OH-Cumarina

Como padrão interno para teste utilizou-se o composto 7-OH-Cumarina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), CAS 93-35-6, $C_9H_6O_3$, massa molecular 162,14, pó amarelo solúvel em etanol até 50 mg/mL, teor 99,4%, armazenado em temperatura ambiente, segundo laudo analítico do fabricante.

3.3 AMOSTRAS DE SORO HUMANO PARA VALIDAÇÃO

As amostras de *pool* de soro normal, hemolisado (contendo hemácias lisadas) e lipêmico (alto teor de lipídios) utilizadas para teste foram gentilmente cedidas pelo laboratório de análises clínicas da Universidade Federal do Paraná e pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR, Curitiba, Brasil).

3.4 PREPARO DE SOLUÇÕES

Para o preparo das soluções estoque, cada substância foi pesada em balança analítica e solubilizada de forma a atingir a concentração de um 1mg/mL. As soluções foram armazenadas em refrigeração (4 °C), em frasco hermeticamente fechado, ao abrigo da luz por período não superior a 15 dias.

Para o cloridrato de vancomicina foi feita a diluição em água ultrapura, para o padrão interno 7-OH-Cumarina foi realizada a diluição em metanol 99%.

Para a obtenção das soluções de trabalho foram realizadas diluições em eppendorf de 1,5 mL adicionando diferentes volumes de água ultrapura e solução estoque através de pipeta automática calibrada conforme descrito na Tabela 3, para atingir as concentrações adequadas aos testes.

Tabela 3 - Diluição do Analito

Composto	Concentração da Solução de Trabalho (mg/L)	Volume de Água Ultrapura (uL)	Volume de Solução estoque (uL)	Volume Final (uL)
7-OH-Cumarina	120	880	120	1000
	12	988	12	1000
	24	976	24	1000
	36	964	36	1000
	60	940	60	1000
Vancomicina	180	410	90	500
	360	320	180	500
	540	230	270	500
	720	140	360	500
	840	80	420	500
	1000	0	1000	1000

Fonte: Autoria própria.

3.5 EQUIPAMENTOS E CONSUMÍVEIS

As análises de validação foram conduzidas em um cromatógrafo líquido Agilent modelo 1100 (Figura 5), bomba G1311A, degasificador G1379A, gerenciador de amostras G1329A, forno G1316A, detector DAD G1315B, software *ChemStation for LC 3D systems* Rev.B.04.03[16] (Agilent Technologies, EUA). Durante as análises o gerenciador de amostras permaneceu sob temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$).



Figura 5 - Sistema Cromatográfico Agilent 1100
Fonte: Autoria Própria

Demais equipamentos utilizados:

- Agitador de amostras VortexGenie Pulse Scientific Industries (Bohemia, EUA);
- Balança Analítica Mettler Toledo, Excellence Plus XP 205, precisão de 0,01mg (Columbus, EUA);
- Centrífuga Refrigerada Eppendorf modelo 5810-R (Hamburg, Alemanha);
- Purificador de água Milli-Q, Milipore A10 Gradient (Milford, EUA);
- Coluna C18 Zorbax 150x4.6mm, 3,5 μ m Agilent Technologies (Santa Clara, EUA);
- Coluna C18 X-Bridge 150x4,6mm, 5 μ m Waters Corporation (Milford, USA);
- Coluna C18 X-Terra 150x4,6mm, 3.5 μ m Waters Corporation (Milford, USA);
- Coluna C8 Zorbax 150x4.6mm, 5 μ m Agilent Technologies (Santa Clara, EUA);

- Coluna C8 X-Brigde 150x4.6mm, 5 um Waters Corporation (Milford, USA);
- Pipeta Labmate HTL (Warsaw, Polônia)
- Pipeta EDP3-Plus RAININ (Columbus, EUA)
- Refrigerador RC 504D Indrel (Londrina, Brasil)
- Freezer REVCO Thermo Electron Corporation (Waltham, EUA)
- Peagâmetro SevenEasy Mettler Toledo (Columbus, EUA)
- Tubo de Reação 1,5 mL Eppendorf (Hamburg, Alemanha)
- Vials Agilent (Santa Clara, EUA);
- Insertos 400 uL Agilent (Santa Clara, EUA);

3.6 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE

3.6.1 Extração do Analito

Ao longo do período de testes foram avaliadas cinco condições de extração utilizando como reagentes para precipitação de proteínas a acetonitrila (ACN), acetonitrila acidificada com ácido clorídrico (ACN+HCl), ácido perclórico (APC), ácido tricloroacético (ATC) e ácido trifluoroacético (ATF) em diferentes concentrações para se definir a melhor recuperação do analito. Os testes foram realizados em triplicata.

3.6.1.1 Extração com Acetonitrila e com Acetonitrila Acidificada com Ácido Clorídrico (HCl)

Para extração com ACN e ACN+HCl utilizou-se a proporção amostra:ACN e amostra: ACN e ACN+HCl de 1:3 e 1:6 (v/v), conforme descrito em literatura (Shen, 2010 e Santos, 2010). Foram adicionados 200 µL de soro fortificados com 50 µL de padrão de vancomicina para atingir a concentração

de 50 mg/L na amostra, seguido de agitação em vórtex por 1 minuto, posteriormente adicionado 750 uL de acetonitrila (1:3) e 1500 uL de acetonitrila (1:6), nova agitação em vórtex, centrifugação a 14000 rpm por 30 min e injeção direta do sobrenadante. O mesmo procedimento foi utilizado para a Acetonitrila acidificada na qual foi adicionado 10% v/v de HCl 3N.

3.6.1.2 Extração com Ácido Tricloroacético

Os testes de extração com ATC foram baseados na abordagem de Cheng, *et al* (2010) e Valle *et al* (2008). Aplicou-se 150 µL de ATC em diferentes concentrações (10, 15, 20, 25, 35 e 40%) a amostras de 200 µL de soro fortificado com 50 µL de padrão de vancomicina para atingir uma concentração de 50 mg/L na amostra.

3.6.1.3 Extração com Ácido Perclórico

A extração foi conduzida com base nos dados de Valle, *et al* (2008) e Favetta, *et al* (2001). Para isso, o ácido foi diluído em água ultrapura para as concentrações de 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60%. Foi adicionado 30 µL de ácido perclórico para 200 µL de matriz fortificada com 50 µL de padrão de vancomicina, para uma concentração final de 50 µg/mL.

3.6.1.4 Extração com Acido Trifluoroacético

A extração com ATF foi baseada nos estudos de Shibata, *et al* (2003) com duas abordagens distintas, inicialmente utilizou-se o ATF nas concentrações de 30, 40, 50 e 60%, numa proporção de soro: ATF de 1:2 (v/v),

com 600 uL de solução com ácido para 300 uL de soro fortificado (soro com adição de analito em concentração conhecida).

Posteriormente, foram utilizados volumes menores de ATF (500, 400, 300, 200, 100, 50, 25 e 10 uL) para 300 uL de soro, com concentrações variadas (60 a 100%) a fim de obter a melhor resposta da extração, com o menor fator de diluição do analito. Por fim foi reduzido o volume de amostra para 100 uL e o ajuste proporcional da concentração e volume do ATF.

3.6.1.5 Ensaio de Recuperação

O percentual de recuperação de cada um dos métodos e o desvio padrão relativo foi estimado pela comparação entre as áreas de resposta do analito em mesma concentração adicionado a matriz após a extração (R_2) e posterior ao procedimento de extração da matriz biológica (R_1) através da equação:

Equação 5:

Recuperação (%) = conc. analito extraído x 100 / conc. analito não extraído

3.6.2 Preparo de Amostras

A partir do soro foram preparadas 3 alíquotas de 100 uL de cada amostra em tubo eppendorf de 1,5 mL, foi adicionado 12,5 uL de PI na concentração de 120 mg/L e 12,5 uL de água ultrapura. As amostras passaram por 1 minuto de agitação em vórtex e em seguida passaram pelo processo de extração com 25 µL de ATF 85% seguido de vortex por 1 minuto, centrifugação a 13000 RPM por 30 minutos e análise do sobrenadante por CLAE. Os resultados foram comparados com os de uma curva de calibração recém-preparada.

3.6.3 Coluna Cromatográfica

Foram testadas colunas cromatográficas C18 e C8 com tamanho de partícula entre a 3,5 – 5 μm , por este ser o mais citado em literatura. As colunas foram submetidas a variações de fluxo e composição de fase móvel de forma a obter o melhor perfil cromatográfico da vancomicina em solução e em matriz.

Foi selecionada a coluna que apresentou melhor relação sinal/ruído entre a área do pico da vancomicina e o ruído estimado da corrida. Também foi considerada a melhor simetria e maior altura de pico na decisão pela coluna.

3.6.4 Otimização da Fase Móvel

Foram avaliadas três composições de fase móvel com as seguintes formulações; acetato de sódio 75 mM com pH 5,0 ajustado por gotejamento com ácido acético (BERTOLUCCI 2007, LÓPEZ *et al* 2008); fosfato monobásico de sódio 5 mM pH 3,5 ajustado com ácido fosfórico (SANTOS *et al.* 2001; JESÚS VALLE *et al* 2008) e ácido trifluoroacético 0,01% (DOAN, 2015). O pH das soluções foi aferido em medidor de pH calibrado. Durante as corridas foram adicionados diferentes percentuais de ACN (entre 5 e 15%), a fim de obter a melhor resolução do analito e menor tempo de corrida.

3.6.5 Preparo da Fase Móvel Final

O preparo da fase móvel utilizada para o estudo de validação consistiu em preparar uma solução de ATF 0,01%, devendo o pH da solução ser mantido entre 2,780 e 2,820. Esta solução é utilizada na proporção de 92% empregando-se 8% de ACN como modificador orgânico.

3.6.6 Otimização das condições cromatográficas

As condições testadas foram: acetato de sódio 75 mM (pH 5,000), fosfato monobásico de sódio 20 mM (pH 3,500) e ATF 0,014% (pH 2,800) em diferentes proporções, sempre se empregando ACN como modificador orgânico, e temperatura de eluição de 40 °C, conforme apresentado na Tabela 4. Para todas as condições aplicou-se o modo de eluição isocrático.

Tabela 4 - Condições Cromatográficas

	Acetato de Sódio	Fosfato de Sódio Monobásico	ATF
Concentração	75 mM	20 mM	0.014%
pH	5.00	3.50	2.80
Percentual de ACN	15%	15%	8%
Percentual de Tampão/Ácido	85%	85%	92%
Temperatura	40 °C	40 °C	40 °C
Fluxo	2 mL/min	2 mL/min	2 mL/min

3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

A validação do método foi realizada de acordo com a RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que trata de métodos bioanalíticos para estudo de medicamentos e o guia de validação de métodos bioanalíticos da FDA. Os testes descritos a seguir foram planejados de forma a atender os requisitos destes documentos (BRASIL, 2012; U.S. 2013).

3.7.1 Curva de Calibração

Para a definição da linearidade foram realizados testes com as concentrações de 2, 5, 15, 30, 45, 60, 70 mg/L em matriz biológica. As corridas foram realizadas em três dias diferentes. Em todos os dias as amostras foram testadas em triplicata. O tempo entre a preparação da amostra e a análise não excedeu 5 horas durante os testes. A linearidade das curvas de calibração foi avaliada por meio do método da padronização interna.

Os resultados da razão área do analito/área do PI para cada concentração nominal foram plotados em um gráfico e a linearidade calculada através da regressão linear de primeiro grau utilizando o software Microsoft Excel ®.

3.7.1.1 Preparo da Curva de Calibração

- Em tubos de reação de fundo cônico de 1,5 mL são adicionados 100 µL de soro;
- São adicionados 12,5 µL de padrão interno à concentração de 120 mg/L;
- São adicionados 12,5 µL de analito em concentração de acordo com a concentração final esperada para a solução conforme a Tabela 5;
- A amostra é submetida à agitação em vórtex por 1 minuto,
- Adicionam-se 25 µL de solução ATF 85% para precipitação de proteínas;
- Agitação em vórtex por 1 minuto;
- Centrifugação a 13000 rpm por 30 minutos;
- São coletados 100 µL de sobrenadante para análise.

Tabela 5 - Preparo da curva de calibração

	Solução de trabalho de vancomicina.	Solução de trabalho de PI	ATF	Matriz biológica	Amostra
Volume adicionado	12,5 µL	12,5 µL	25 µL	100 µL	150 µL
Rótulo	Concentração				
LD	12 mg/L	120 mg/L	85%	-	1 mg/L
LIQ	24 mg/L	120 mg/L	85%	-	2 mg/L
CQB	60 mg/L	120 mg/L	85%	-	5 mg/L
-	180 mg/L	120 mg/L	85%	-	15 mg/L
CQM	360 mg/L	120 mg/L	85%	-	30 mg/L
-	540 mg/L	120 mg/L	85%	-	45 mg/L
CQA	720 mg/L	120 mg/L	85%	-	60 mg/L
LSQ	840 mg/L	120 mg/L	85%	-	70 mg/L
CQD	1000 mg/L	120 mg/L	85%	-	83,33 mg/L

Os critérios de aceitação da curva de calibração foram CV% e ER% inferior a 15%, em pelo menos 75% dos padrões de calibração da curva.

3.7.2 Limites de detecção e quantificação

Para determinação dos limites de detecção e quantificação do método foram testadas, em triplicata, amostras em matriz biológica fortificadas com o analito nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3 e 5 mg/L. Para a definição do limite de detecção (LD) considerou-se a menor concentração que produziu relação sinal/ruído igual ou superior a 3.

Para a definição do limite inferior de quantificação (LIQ) considerou-se a menor concentração cuja resposta obteve relação sinal ruído superior a 10 (BRASIL, 2012).

3.7.3 Seletividade

Para o teste de seletividade foram utilizadas 6 amostras de seis fontes diferentes, sendo quatro amostras de soro branco, uma de soro hemolisado e uma de soro lipêmico e uma amostra com concentração de LIQ. As amostras passaram pelo método de extração definido no item 3.6.2 e foram avaliadas por cromatografia. Os sinais de interferentes próximos ao tempo de retenção do analito e do PI foram avaliados quanto à intensidade, área e altura no cromatograma, foi considerado o critério de aceitação que picos interferentes no tempo de retenção do analito tivessem resposta inferior a 20% da resposta do LIQ e picos interferentes no tempo de retenção do PI com resposta inferior a 5% da área do PI. (BRASIL, 2012).

3.7.4 Efeito Residual

O efeito residual foi avaliado através da corrida de uma amostra em branco, seguida de uma amostra com concentração LSQ, e em seguida duas amostras em branco. Foi avaliado o aparecimento de picos interferentes próximos do tempo de retenção do analito e do PI. Foi considerado o critério de aceitação que eventuais picos interferentes no tempo de retenção do analito tivessem resposta inferior a 20% da resposta do LIQ e picos interferentes no tempo de retenção do PI com resposta inferior a 5% da área do PI. (BRASIL, 2012). Para a realização do teste o analito e o PI interno foram incorporados a matriz biológica para obter a concentração de 70 mg/L de vancomicina e 10 mg/L de PI e extraídos pelo método. O branco foi definido com aplicação de 100uL de soro e 25 uL de água seguido pelo processo de extração.

3.7.5 Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado através do cálculo do FMN. Foram analisadas 8 amostras de fontes distintas, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas, nas concentrações de CQB e CQA. As amostras passaram pelo processo de extração conforme descrito em 3.7.1.1. Os resultados foram comparados com 4 replicatas nas concentrações de CQB e CQA em solução com água ultrapura. Amostras de soro normal de quatro fontes distintas e amostras de soro hemolisado e lipêmico de duas fontes distintas foram fortificadas com analito e PI. A razão entre a área do pico da vancomicina pelo PI foi comparada com a razão entre a área do pico da vancomicina pelo PI em solução para obtenção do FMN. Segundo a legislação vigente o CV% do FMN deve ser inferior a 15%.

3.7.6 Precisão e Exatidão

O ensaio de validação da precisão e exatidão do método foi realizado com as amostras nas concentrações de LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD em matriz biológica, preparadas conforme o item 3.7.1.1. Foram testadas 4 réplicas para cada concentração e foram testadas três corridas em três dias diferentes. A concentração experimental foi determinada com base na curva de calibração do dia, a partir da razão entre o sinal do analito e o sinal do PI. A partir dos dados calculou-se a CV% intra e interdia (Precisão) e o ER% intra e interdia (Exatidão). O critério de aceitação tanto CV% quanto ER% inferior a 15%.

3.7.7 Estabilidade

A estabilidade do analito e PI foi testada nas seguintes condições; estabilidade da solução de trabalho em bancada em temperatura ambiente

controlada por ar condicionado a 20°C, estabilidade da solução estoque sob refrigeração a 4°C, estabilidade de curta duração em matriz, estabilidade pós processamento, estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento e estabilidade de longa duração em matriz

A estabilidade é aprovada quando o CV% e o ER% observado não for superior a 15% na média das concentrações obtidas em comparação a concentração nominal.

3.7.7.1 Estabilidade das soluções de trabalho em bancada

Foram avaliadas as estabilidades das soluções de trabalho adequadas para a composição da concentração de CQA, CQB e PI, conforme descrito na Tabela 5. As soluções para teste de estabilidade em bancada foram mantidas em temperatura ambiente (climatizado à 20°C) por 4 horas e foram posteriormente aplicadas para análise conforme descrito no item 3.7.1.1, nas concentrações de CQA e CQB em triplicata. Os resultados foram comparados com uma curva padrão recém preparada. Os critérios de aceitação foram CV% e ER% inferior a 15%.

3.7.7.2 Estabilidade da solução estoque

Foi preparada uma solução estoque de vancomicina a 1mg/mL em água ultrapura e uma solução estoque de PI de 1mg/mL em metanol 99%. As soluções foram armazenadas em freezer -20°C por 20 dias.

Após este período as soluções estoque foram diluídas para a concentração de 50 mg/L. Os resultados foram comparados com os de uma solução recém preparada de analito e uma solução recém preparada de PI. As soluções foram aprovadas quando a variação foi inferior a 10%.

3.7.7.3 Estabilidade pós processamento

Para o teste de estabilidade pós-processamento foram preparadas, em triplicata, alíquotas de 100 µL de soro adicionadas de 12,5 µL de solução contendo vancomicina e 12,5 µL de solução contendo o PI, de modo a obter concentrações de CQB e CQA e 10 mg/L de PI.

As amostras foram submetidas à extração por precipitação de proteínas com ATF, conforme descrito no item 3.7.1.1 As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente por 5 horas. Após esse período, as amostras foram analisadas por CLAE-DAD, calculando-se as concentrações de acordo com curva de calibração recém - preparada. Os critérios de aceitação foram CV% e ER% inferior a 15%.

3.7.7.4 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de longa e curta duração.

Para os testes de estabilidade dos analitos em matriz biológica foram preparadas, em triplicata, alíquotas de 100 µL de soro adicionadas de 12,5 µL de solução contendo vancomicina e 12,5 µL de solução contendo o PI de modo a obter concentrações de CQB e CQA e 10 µg/L de PI. As amostras foram misturadas em vórtex durante 1 min. Para o teste de estabilidade, após ciclos de descongelamento, a amostra foi armazenada por 3 ciclos de 24 horas em freezer a -20 °C. Entre cada ciclo as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente.

Para o teste de estabilidade de curta duração as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 8 horas. Para o teste de estabilidade de longa duração as amostras foram mantidas em freezer -40°C por 20 dias. Após os respectivos períodos de armazenamento as amostras foram submetidas ao processo de extração e analisadas de acordo com curva de calibração recém - preparada. Os critérios de aceitação foram CV% e ER% inferior a 15%.

3.8 ELABORAÇÃO DO PROTOCOLO DE MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA

O protocolo de monitorização terapêutica para vancomicina foi construído com a colaboração de profissionais do corpo clínico e do Núcleo de Pesquisa Clínica (NUPE) do Hospital Pequeno Príncipe (HPP) e com base em revisão bibliográfica, artigos científicos e recomendações aplicadas por hospitais que já realizam a monitorização terapêutica da vancomicina em sua rotina.

Foi realizado um estudo junto aos profissionais do hospital Pequeno Príncipe para viabilizar as coletas e interpretação de resultados de análise.

3.9 AVALIAÇÃO DE PACIENTES

Para avaliar a aplicabilidade do método na prática foram colhidas amostras de pacientes da UTI Neonatal do HPP, mediante aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A),. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdades Pequeno Príncipe (CEP-FPP), sobre o registro CAAE nº: 27459814.4.0000.5580.

Foram incluídos os pacientes internados em UTI neonatal em tratamento com vancomicina, com expectativa de terapia maior ou igual a 5 dias, entre os meses de outubro e dezembro de 2015. Foram excluídos os pacientes que não apresentaram condições clínicas para que seja realizada a coleta de sangue ou que não possuíam acesso venoso adequado para coleta.

Foram incluídos 10 participantes neste estudo dos quais foram avaliadas um total de 17 amostras de soro, coletadas após o estado de estabilidade de concentração (após terem sido administradas no mínimo 3 doses do fármaco) e que se apresentavam no NB de concentração sanguínea da vancomicina (em até 30 minutos antes do horário de administração da próxima dose do fármaco). Para preservar a identidade dos participantes ao longo deste trabalho, a identificação foi realizada através de codinome, que consiste de

uma letra do alfabeto (A,B...H, I) atribuída a cada paciente durante a sua participação no estudo.

As coletas foram realizadas na UTI Neonatal do Hospital Infantil Pequeno Príncipe pela equipe clínica da própria UTI. O processamento e armazenamento das amostras foram realizados pelo Núcleo de Pesquisa Clínica do Hospital Pequeno Príncipe.

Foram colhidos de 0,5 a 1,0 mL de sangue em tubo com gel separador. As amostras foram mantidas em congelamento a -20°C até o momento da análise, por um período não superior a 7 dias. O soro foi separado por centrifugação a 3.500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram preparadas conforme seção 3.6.2.

Foram coletadas informações de prontuário dos pacientes relativas a: nome, classificação do recém-nascido (termo ou pré-termo), idade, data do início do tratamento com vancomicina, dose de vancomicina, intervalo de tempo entre as dose intermitentes, data do término do tratamento, ocorrência de mudança na terapia com antimicrobianos, data da coleta do *clearance* de creatinina (CC), CC antes do tratamento, CC no final do tratamento, piora da função renal (sim ou não), data e horário da coleta de amostra para dosagem de vancomicina, horário da administração da próxima dose de vancomicina, número da dose, conduta clínica, data da coleta de hemocultura, agente etiológico isolado em cultura, CIM do agente, resposta clínica do tratamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No texto a seguir são descritos os resultados obtidos no desenvolvimento e a validação do método analítico, construção do protocolo de ajustes de dose e os resultados dos testes realizados em amostras dos participantes desta pesquisa.

4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

4.1.1 Extração do Analito

O processo de extração foi um ponto crítico no desenvolvimento desta técnica. O objetivo foi construir um método de simples execução, rápido, de baixo custo e com exigência de poucos equipamentos para ser realizado. Com base em pesquisa na literatura, diversos agentes de extração foram testados a fim de se obter uma maior recuperação do analito de interesse. Como o objetivo foi desenvolver um método rápido e de baixo custo, optou-se por reduzir etapas adicionais e mais dispendiosas de purificação da amostra como a evaporação em fluxo de nitrogênio, ultrafiltração do sobrenadante e a extração em fase sólida.

4.1.1.1 Extração com Acetonitrila

O primeiro método de extração avaliado empregou acetonitrila (ACN), conforme referido por López *et al.* (2007). O autor refere que o método apresentou linearidade de 0,4 a 100 µg/mL para a vancomicina, com correlação linear maior que 0.998 e recuperação de 95.7%. Porém, a partir dos resultados iniciais obtidos, pôde-se perceber que este método não foi satisfatório. Para

que a extração com ACN seja realizada, é necessário adicionar um volume relativamente grande deste solvente na matriz (de 3 a 6 partes de ACN para 1 parte de plasma), o que causa diluição do analito. Quando utilizado menores volumes de ACN para a extração do analito de interesse, as proteínas do plasma não precipitaram totalmente deixando a amostra turva, tornando obrigatória uma etapa adicional de filtração da amostra. Por este motivo, caso a ACN fosse utilizada para precipitar as proteínas na proporção ideal, seria necessária uma etapa posterior de evaporação das amostras em fluxo de nitrogênio, o que não seria adequado aos objetivos deste trabalho. Tentou-se obter uma resposta satisfatória com a diluição de 3 partes de ACN para 1 parte de plasma. Porém, a recuperação ficou abaixo de 10% e a sensibilidade foi insuficiente para atingir as concentrações mínimas a serem mensuradas.

Também foi testada a extração com ACN acidificada com ácido clorídrico (HCL). Esta alteração do método foi relatada por Shen, (2008) e, segundo este autor, deveria garantir uma extração mais eficiente do analito e um sobrenadante com menos contaminantes. A vancomicina apresenta uma maior solubilidade em pH próximo de 3 e uma menor solubilidade em pH próximo a 4 (FDA, 2008), desta forma justificou-se testar a extração com ACN acidificada.

Nos testes realizados neste estudo, porém, não houve ganho significativo na extração com ACN acidificada em relação a extração com ACN sem acidificação (Figura 6).

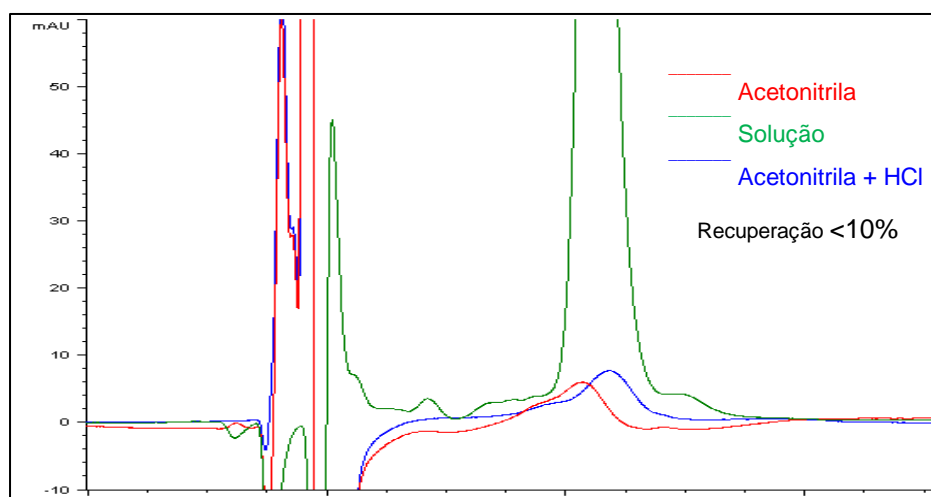


Figura 6 - Comparativo de cromatogramas entre a extração com ACN e ACN+HCL. Dados: Esta figura sobrepõe os resultados cromatográficos obtidos com a extração da vancomicina sérica com ACN+HCL (vermelho), ACN (azul), e da matriz sérica fortificada com o analito após a precipitação das proteínas séricas (verde).

4.1.1.2 Extração com Ácido Tricloroacético

O ácido tricloroacético (ATC) foi referido como agente de extração pelos autores Cheng, *et al* (2010) e Valle, *et al* (2008). Cheng, *et al* (2010) comparou a extração de vancomicina através de ATC e de ACN para realizar a extração da vancomicina em plasma e realizou a análise por CLAE-EM, obtendo resultados melhores com o ATC. A precipitação proteica com solventes orgânicos (ACN), apresentou níveis de recuperação em torno de 20% para a vancomicina, dado que corrobora com os testes realizados neste estudo. Uma melhor recuperação pode ser obtida aplicando ácidos clorados como o próprio ATC e o ácido perclórico (APC).

Segundo o autor, a extração com estes ácidos não depende tanto do pH da solução. Porém, apresenta forte dependência da presença do grupo tricloro nos ácidos (CHENG *et al.* 2010). Este método, a princípio, aparentou ter uma melhor recuperação em comparação com a extração realizada apenas com a ACN no presente estudo. Contudo, devido a interferentes com sinal muito intenso presentes no próprio ATC, a resolução do analito tornou-se prejudicada, conforme demonstrado na figura 7.

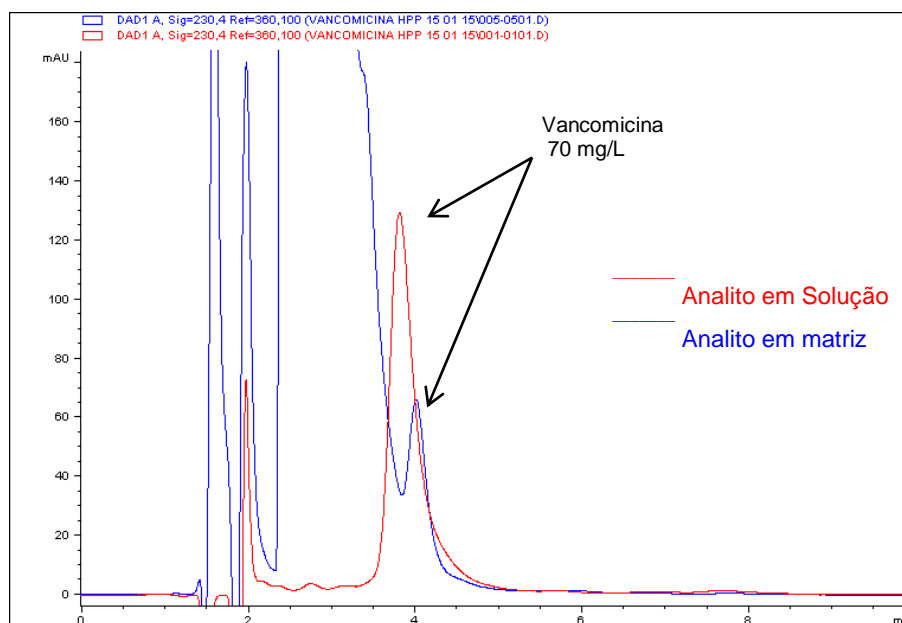


Figura 7 - Extração da vancomicina com ATC 35%.

Dados: Esta figura sobrepõe o perfil cromatográfico obtido com o analito em solução e após a sua extração da matriz com o ácido na concentração de 35%. Em azul, o sinal do analito apresenta-se sobreposto pelo interferente do ATC. A curva em vermelho apresenta o perfil da substância em solução.

Nos artigos em que o ATC foi citado, o método de análise empregado foi a CLAE acoplada à espectrometria de massas (EM). A seletividade do EM para o analito de interesse é superior à apresentada pelos métodos espectrofotométricos (UV, DAD), permitindo a detecção da vancomicina sem interferência dos contaminantes inespecíficos presentes no ATC. Testaram-se diferentes concentrações de ATC (5% a 60%), dentre as quais a melhor resposta em termos de recuperação e precipitação se deu na concentração de 35% (Figura 8). No entanto, mesmo nesta concentração, não foi obtida resolução satisfatória do analito de interesse, impossibilitando a quantificação precisa do mesmo.

Em concentrações inferiores a 15% o ATC foi incapaz de precipitar totalmente as proteínas plasmáticas, deixando resíduos no sobrenadante. Acima de 35% de ATC notou-se a formação de precipitados amarelos no sobrenadante, resultantes de excesso de ácido ou impurezas na solução.

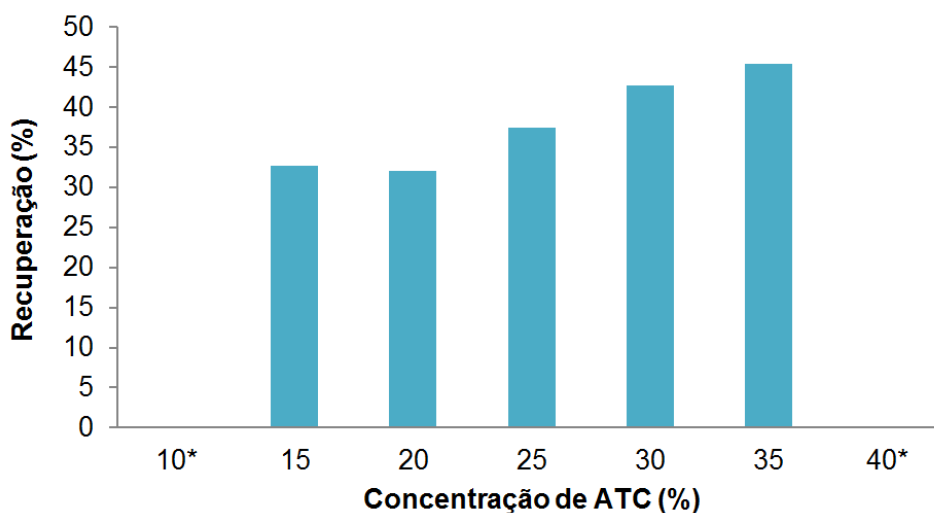


Figura 8 - Percentuais de recuperação da vancomicina empregando o método de precipitação proteica com ATC nas concentrações de 10 a 40%.

Dados: Aplicou-se 150 μ L de ATC em diferentes concentrações (10, 15, 20, 25, 35 e 40%) a amostras de 200 μ L de soro fortificado com 50 μ L de padrão interno de vancomicina para atingir uma concentração de 50 mg/L na amostra.

*A precipitação de proteínas não foi satisfatória nestes percentuais de concentração.

4.1.1.3 Extração com Ácido Perclórico e Ácido Trifluoroacético

O uso do APC como agente de precipitação de proteínas foi referido por Valle *et al.*, (2008), Luksa *et al.* (1985), e Favetta *et al.* (2001). O percentual de recuperação da droga após a extração relatado nestes trabalhos variou entre 62% e 100% em análises feitas com CLAE-UV com linearidade entre 0.4 e 350 mg/L para o analito de interesse, representando um bom potencial para este estudo.

O ATF como agente de precipitação foi referido por Shibata *et al.* (2003), que realizou estudos em plasma de rato através de CLAE-EM. Baranowska *et al.* (2010), aplicou o ATF em análises com CLAE-DAD obtendo uma linearidade de 0.03 a 20 mg/L e recuperação de até 85% para a vancomicina.

Os testes utilizando APC e ATF como agentes precipitantes de proteínas não evidenciaram a presença dos interferentes observados na extração com ATC.

Foram testadas diferentes concentrações de APC e ATF (10% a 60%) a fim de se verificar em qual concentração resultaria na melhor recuperação do analito de interesse após extração deste da matriz biológica.

Os melhores resultados nesta etapa se deram com APC a 30% e ATF a 30%. O APC apresentou melhor resolução (Figura 9), porém menor percentual de extração, o que poderia reduzir a sensibilidade final do método. Já o ATF apresentou a melhor recuperação dentre todos os reagentes testados (Figura 10), embora a resolução fosse ainda insuficiente.

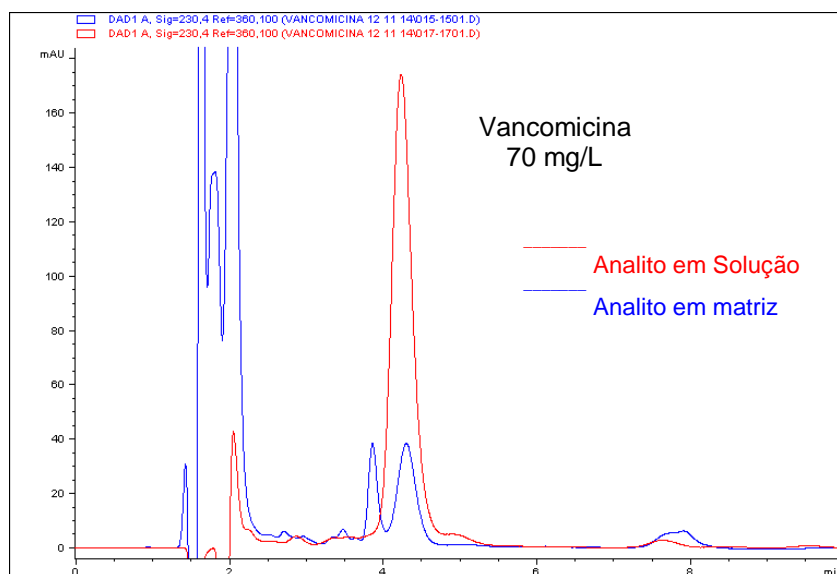


Figura 9 - Extração do analito com APC 30%.
 Dados: Vermelho: Analito em solução (70 mg/L), Azul: Analito em matriz biológica (70 mg/L). Este gráfico sobrepõe a cromatografia obtida com o padrão em solução com a cromatografia obtida após a extração do analito em matriz biológica aplicando-se o APC a uma concentração de 30%.

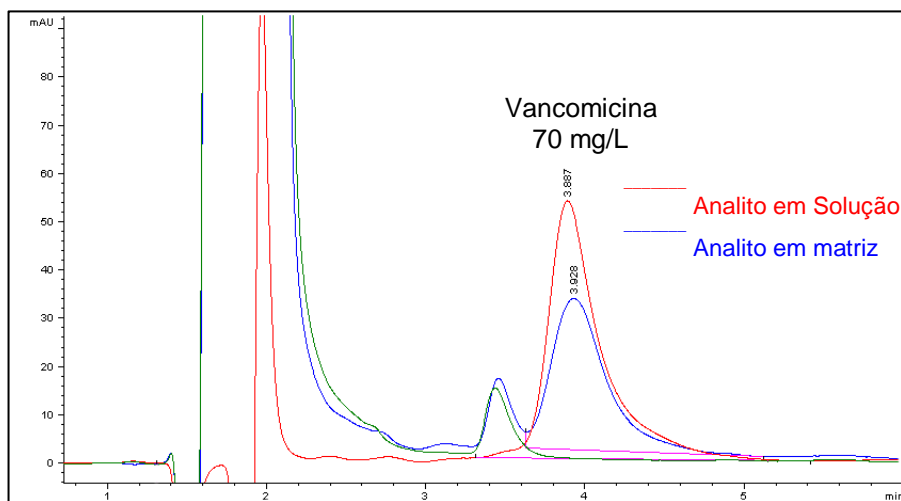


Figura 10 - Extração do analito com ATF 30%
 Dados: Vermelho: Analito em solução (70 mg/L), Azul: Analito em matriz biológica (70 mg/L). Este gráfico sobrepõe a cromatografia obtida com o padrão em solução com a cromatografia obtida após a extração do analito em matriz biológica aplicando-se o ATF a uma concentração de 30%.

4.1.1.4 Otimização da extração

Dentre os testes de extração realizados nesta etapa inicial o mais promissor foi o que empregou ATF para a extração da vancomicina do soro, conforme demonstrado na Figura 11. A partir do resultado deste teste buscou-se melhorar esta extração testando mais variações de proporção e concentração do ácido.

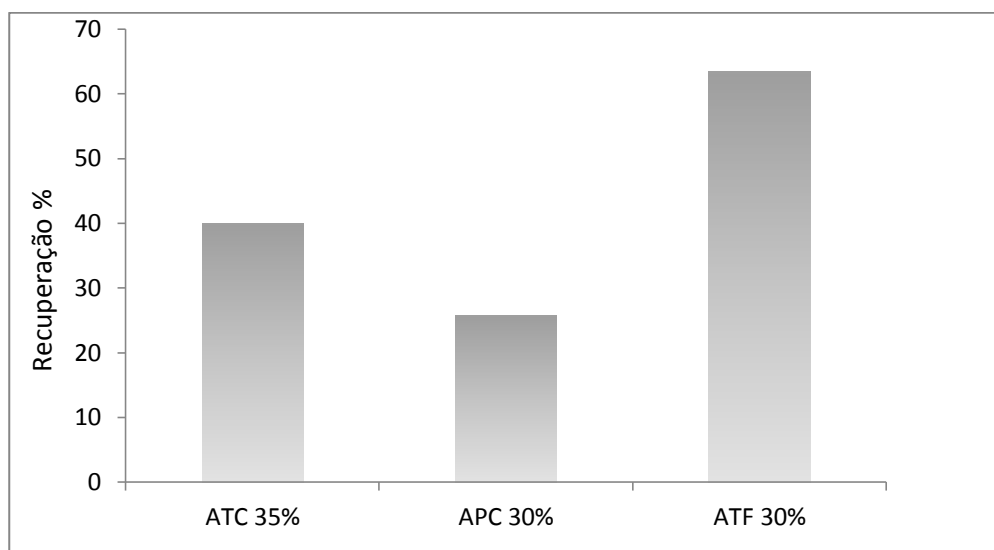


Figura 11 - Comparativo dos testes de extração da vancomicina em soro. Dados: Empregou-se Ácido Tricloroacético (ATC) 35%, Ácido Perclórico (APC) 30% e Ácido Trifluoroacético (ATF) 30% representados em termos da recuperação do analito de interesse após precipitação das proteínas.

Um dos fatores que influencia o processo de extração é a diluição final da amostra. Com o propósito de reduzir a diluição e aumentar a sensibilidade do método, aplicou-se um menor volume de ATF com maior concentração do que aquelas descritas em literatura. Foram aplicados volumes reduzidos (10 a 50 μ L) e com menor diluição do ATF, em concentrações de 60 a 100%. Depois destas alterações, foi possível melhorar o processo de extração aplicando apenas 25 μ L de ácido em uma concentração de 85% para uma amostra de 125 μ L de soro adicionado de PI. Obteve-se a precipitação completa das proteínas e recuperação superior a 70% (Figura 12).

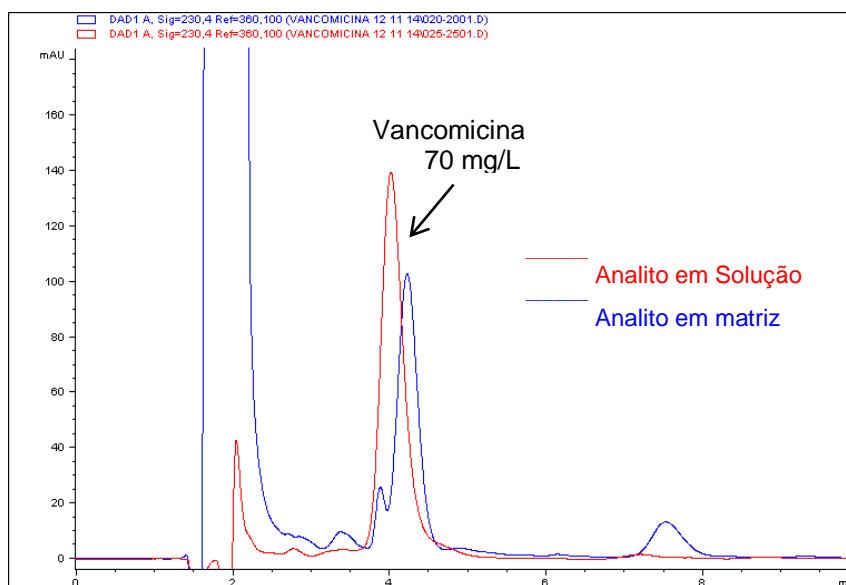


Figura 12 - Extração com ATF 85%, vancomicina a concentração de 70 $\mu\text{g/mL}$. Vermelho: Analito em solução, Azul: Analito em matriz biológica. Este gráfico sobrepõe a cromatografia obtida com o padrão em solução e a cromatografia obtida após a extração do analito em matriz biológica, aplicando-se o ATF a 85%.

4.1.2 Seleção da Coluna Cromatográfica

O método foi testado em diferentes colunas cromatográficas sendo avaliadas a melhor resolução, relação sinal/ruído e simetria dos picos cromatográficos obtidos referentes à vancomicina e ao padrão interno. As colunas testadas estão descritas no item 3.6.3. Entre os autores consultados, predominou-se o uso de colunas com 5 μm de partícula (Tabela 2). Porém, os testes realizados com as colunas de partícula de 3.5 μm apresentaram melhor performance. Os melhores resultados, em relação aos quesitos avaliados, foram obtidos com a coluna C18 Zorbax Eclipse com partícula de 3.5 μm , e dimensões de 4,6x150 mm, cuja resposta cromatográfica está demonstrada na Figura 13. Notou-se uma maior estabilidade de linha de base, simetria e intensidade de pico, com maior reprodutibilidade dos resultados e menor ruído. Um dos fatores determinantes para a escolha desta coluna foi o tempo de retenção do analito, que foi o menor entre as colunas testadas em condições semelhantes (6.2 min).

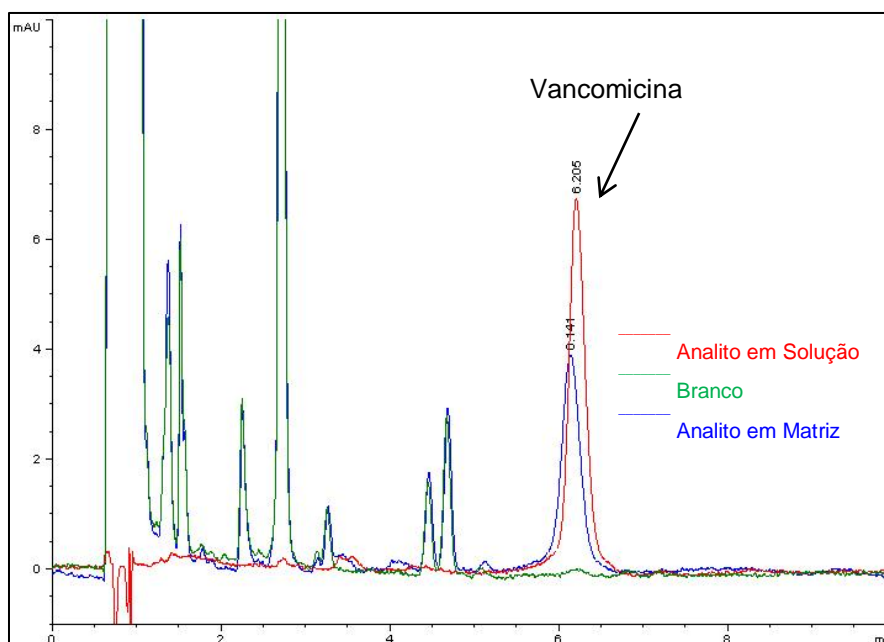


Figura 13 - Cromatograma obtido na Coluna C18 Zorbax 3.5 μm , 4.6x150mm. Dados: Esta figura sobrepõe os resultados cromatográficos obtidos com a matriz biológica sem analito (branco), a resposta do analito em solução e a resposta do analito após o processo de extração do soro, na coluna Zorbax C18 3.5 μm , 4.6x150mm.

A coluna X-Terra C18 3.5 μm , 4.5x150 mm apresentou uma resolução muito baixa em comparação com as demais (Figura 14), pois o pico do analito em matriz apresentou-se assimétrico, com maior largura e maior tempo de retenção (cerca de 9 min.).

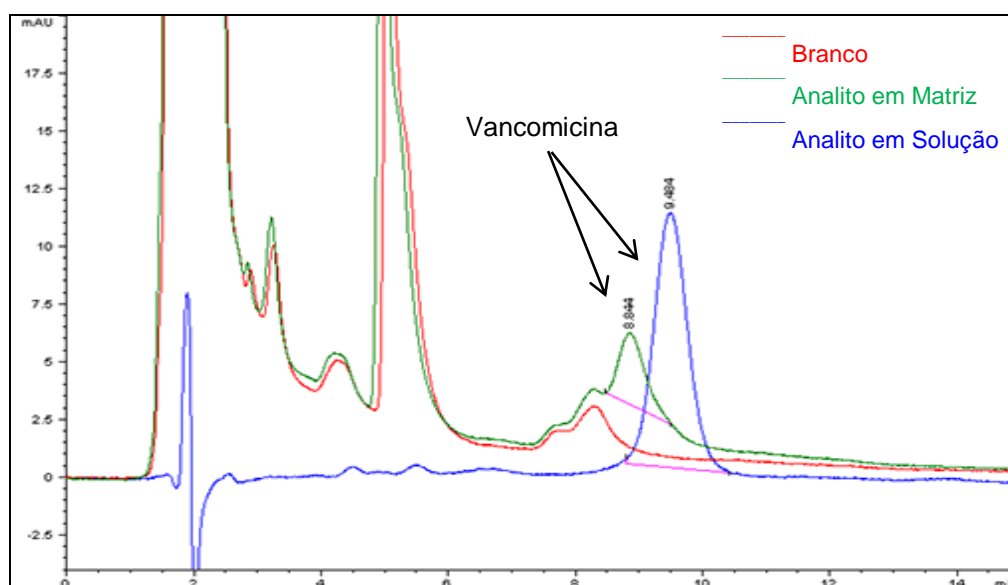


Figura 14 - Cromatograma obtido na Coluna C18 X-Terra 3.5 μm , 4.6x150mm. Dados: Nesta figura sobrepõem-se os resultados cromatográficos obtidos com a coluna X-Terra, do analito em solução, o analito após o procedimento de extração e a matriz biológica sem o analito.

A coluna C18 X-Bridge com partícula de 5 μm , e dimensões de 4.6x150mm, também apresentou bons resultados em termos de resolução e intensidade do sinal. No entanto, notou-se maior ruído em linha de base (Figura 15) e maior tempo de retenção (7 minutos) em relação a coluna Zorbax (6 min).

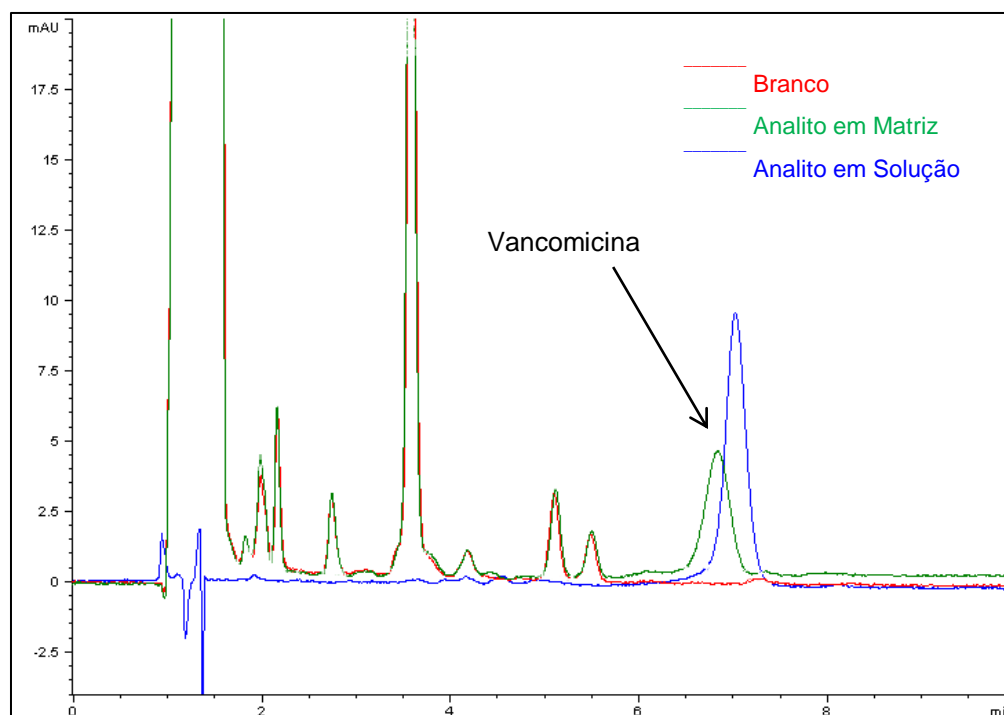


Figura 15 - Cromatograma obtido na Coluna C18 X-Bridge 5 μm . 4.6x150 mm.

Dados: - - analito em solução, — analito em matriz biológica, ... branco. Esta figura sobrepõe os resultados cromatográficos obtidos com a coluna X-Terra, do analito em solução, o analito após o procedimento de extração e a matriz biológica sem o analito.

4.1.3 Fase móvel

Os resultados obtidos empregando como fase móvel tampão acetato de sódio 20 mM (pH, 5,0) 90% e ACN 10% apresentaram baixa relação sinal/ruído, mesmo quando os compostos de interesse eram analisados apenas em solução aquosa (Figura 16). Tal resultado foi inesperado visto que esta composição de fase móvel foi utilizada em outros trabalhos como Lopez *et al.* (2007) e Berthoin *et al.* (2009), com limites de detecção próximos a 1 mg/L.

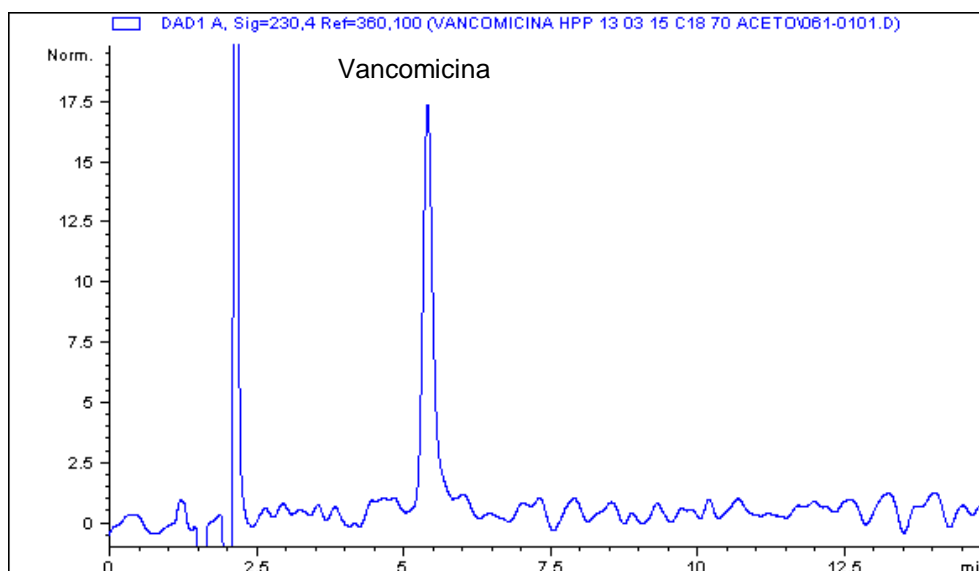


Figura 16 - Perfil Cromatográfico da utilizando-se como fase móvel Acetato de Sódio 75 mM 85% e 15% de ACN em coluna C18.
 Dados: Vancomicina em solução aquosa (20 mg/L)Fluxo 2 mL/min, Temperatura controlada a 40°C.

Devido a maior solubilidade da vancomicina em pH ácido (FDA, 2008), avaliou-se condições de fase móvel com pH mais baixo, a fim de possivelmente melhorar a recuperação e a cromatografia em si. O fosfato monobásico é uma opção de tampão para pH mais baixo se comparado ao acetato de sódio, sendo capaz de tamponar soluções na faixa de pH 3 a 4. Métodos que envolveram a aplicação de fase móvel com tampão fosfato foram relatadas por alguns autores para a determinação da vancomicina. Valle *et al.* (2008), obteve a resolução do pico do analito em 8,5 minutos e limite de quantificação de 0,1 mg/L. O fosfato monobásico foi aplicado por Hagigara (2013), para quantificação da vancomicina em plasma, soro e lavado broncoalveolar obtendo linearidade de 1 a 80 mg/L com um tempo de retenção de 11 minutos.

Os resultados cromatográficos obtidos empregando-se fosfato monobásico de sódio 20 mM (pH 3,5) 85% e ACN 15% como fase móvel demonstraram um aumento no tempo de corrida em relação às outras composições de fase móvel, porém similares ao relatado em literatura. Notou-se diminuição na simetria e altura do pico, mesmo com ajustes de fluxo e proporção de ACN presente na fase móvel (Figura 17).

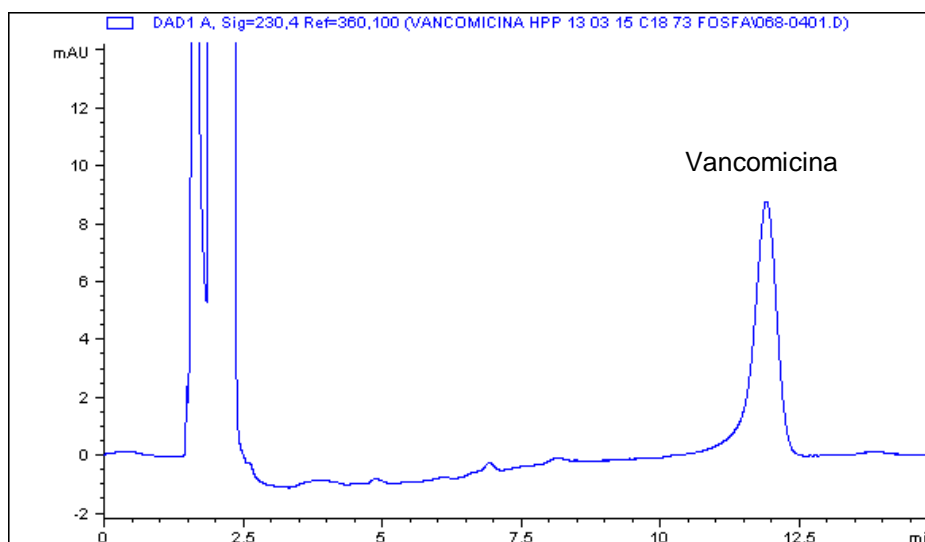


Figura 17 - Perfil Cromatográfico da vancomicina em solução aquosa a concentração (20 mg/L). Dados: Resultados obtidos empregando-se fosfato monobásico de sódio 20 mM (pH 3.5) 85% e ACN 15% como fase móvel demonstraram em coluna C18. Fluxo 2 mL/min, Temperatura controlada a 40°C.

Os melhores resultados foram obtidos utilizando a fase móvel composta por 92% de ATF 0,014% (pH 2,80) e 8% de ACN eluída a temperatura de 40°C sob fluxo de 2mL/min. Esta condição resultou em uma corrida analítica com tempo total de 11,5 minutos, com melhor separação e relação sinal/ruído do analito e do PI (Figura 18).

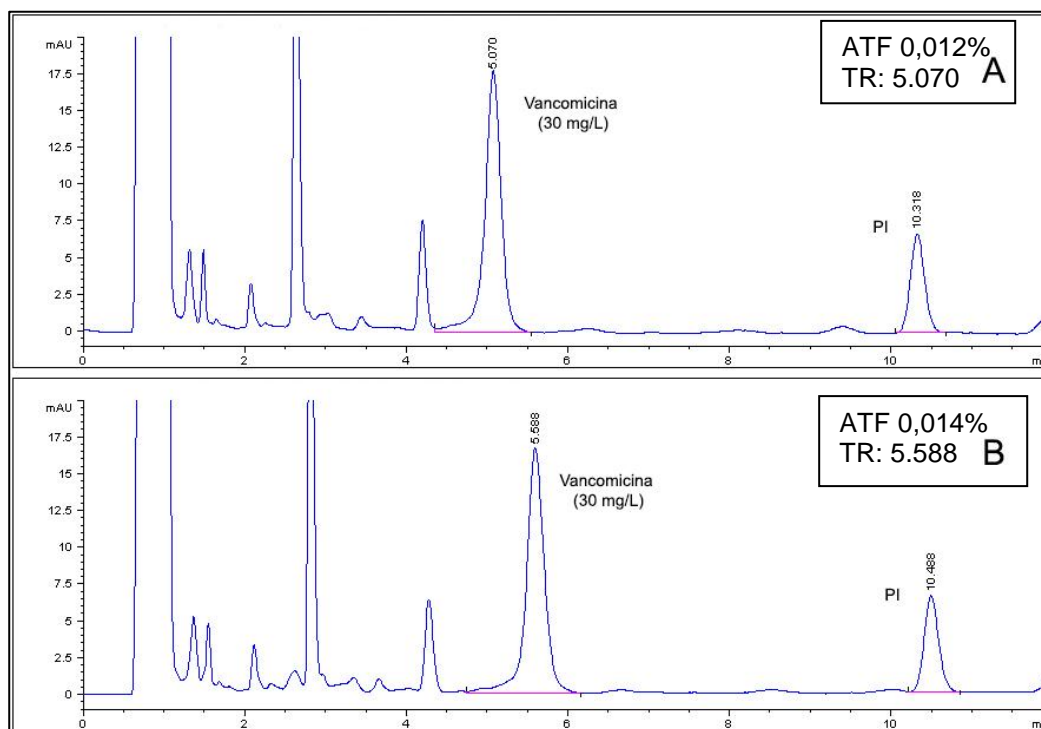


Figura 18 - Cromatogramas obtidos com fase móvel composta de ATF. Dados: Fase móvel composta de 92% solução ATF, 8% de ACN, fluxo de 2mL/min e temperatura controlada a 40°C. Analito Vancomicina (30 mg/L) e PI (10 mg/L) em Matriz Biológica. A) Solução de ATF 0.012% (pH 3.0) B) Solução ATF 0.014% (pH 2.8)

O pH da fase móvel foi um ponto crítico para correta separação do analito dos demais componentes da matriz biológica. A aferição do pH da solução de TFA aplicada a composição da fase móvel é indispensável e deve ser mantido próximo a 2,80 (± 0.05)

4.1.4 Padrão Interno

Na literatura, alguns exemplos de padrões internos aplicados na avaliação da vancomicina foram a cafeína (HAGIGARA, *et al* 2012) e antibióticos como, teicoplanina (WANG *et al* 2014) e cefuroxima (LÓPEZ *et al* 2007). Devido a aplicação do método em análise clínica, buscou-se evitar o uso de fármacos de uso hospitalar como padrão interno.

A escolha do padrão interno foi posterior à definição da coluna, extração e fase móvel. A substância escolhida foi a 7-hidroxycumarina (Figura 19), por ser esta uma substância com boa resposta cromatográfica no método aplicado, além de ser um composto estritamente vegetal (VASCONCELOS *et al* 2008), sendo pouco provável que os pacientes hospitalizados apresentem quantidades significativas deste metabólito em circulação. Em estudo farmacocinético após a administração de xarope de guaco contendo 7-hidroxycumarina, foram detectados apenas traços da substância (<40 ng/mL) (GASPARETTO, 2013), o que não comprometeria a quantificação proposta por este método.

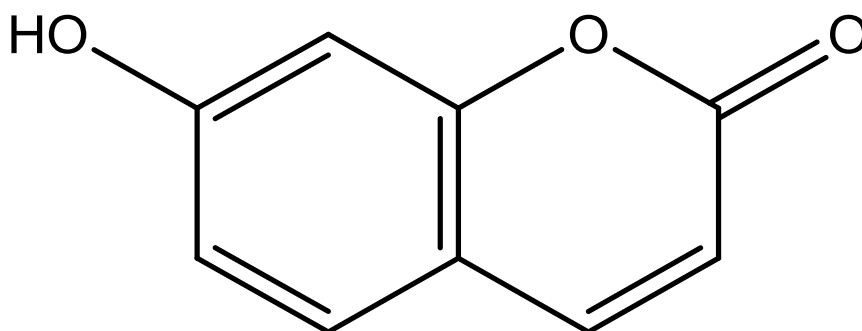


Figura 19 - Estrutura Química Da 7-Hidroxycumarina.
Fonte: National Center For Biotechnology Information, 2015.

4.1.5 Resumo das condições cromatográficas

Coluna: Zorbax Eclipse XDB C18 3,5 μ m 4,6 x 150 mm

Fase móvel: ATF 0,014%, pH 2,8 (92%) + Acetonitrila (8%)

Temperatura da Coluna: 40 °C

Fluxo: 2 mL/min

Volume de Injeção: 20 μ L

Comprimento de onda de detecção: 230,4 nm

Tempo de retenção do analito: 5,5 min

Tempo de retenção do PI (10 mg/L): 10,5 min

Tempo total de análise: 12 min

4.2 VALIDAÇÃO

Nesta seção são descritos e discutidos os resultados obtidos para a validação do método.

4.2.1 Seletividade

A seletividade denota a capacidade do sistema em separar o analito de demais componentes da matriz que podem aparecer na cromatografia. A RDC 27/2012 exige que sejam testadas 4 amostras de 4 fontes diferentes.

Os testes de seletividade foram realizados com soro branco (Figura 20), hemolisado (Figura 21) e lipêmico (Figura 22). Em nenhuma das matrizes testadas foi observada a presença de interferentes no tempo de retenção cromatográfica da vancomicina ou do padrão interno.

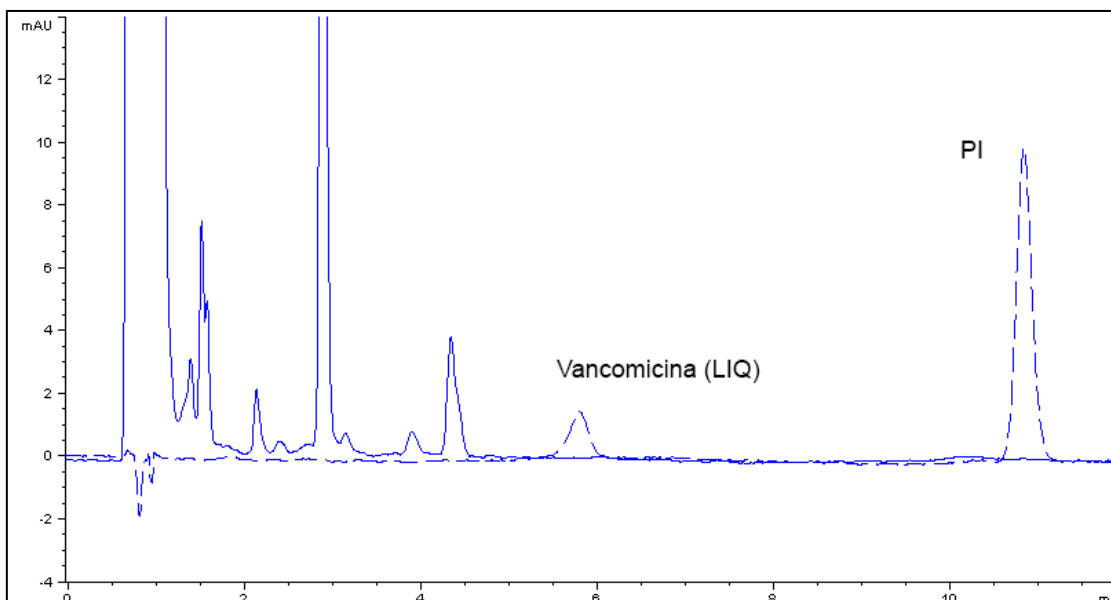


Figura 20 - Cromatograma obtido a partir do teste de Seletividade em Soro Normal.
Dados: Esta figura sobrepõe os resultados cromatográficos obtidos com a matriz sem adição de PI e os resultados da análise do analito em concentração de LIQ (2 mg/L) e do padrão interno (10mg/L), - - analito em solução, — soro branco. Fase móvel TFA 0.014%, 8% de ACN, fluxo de 2mL/min e temperatura controlada a 40°C.

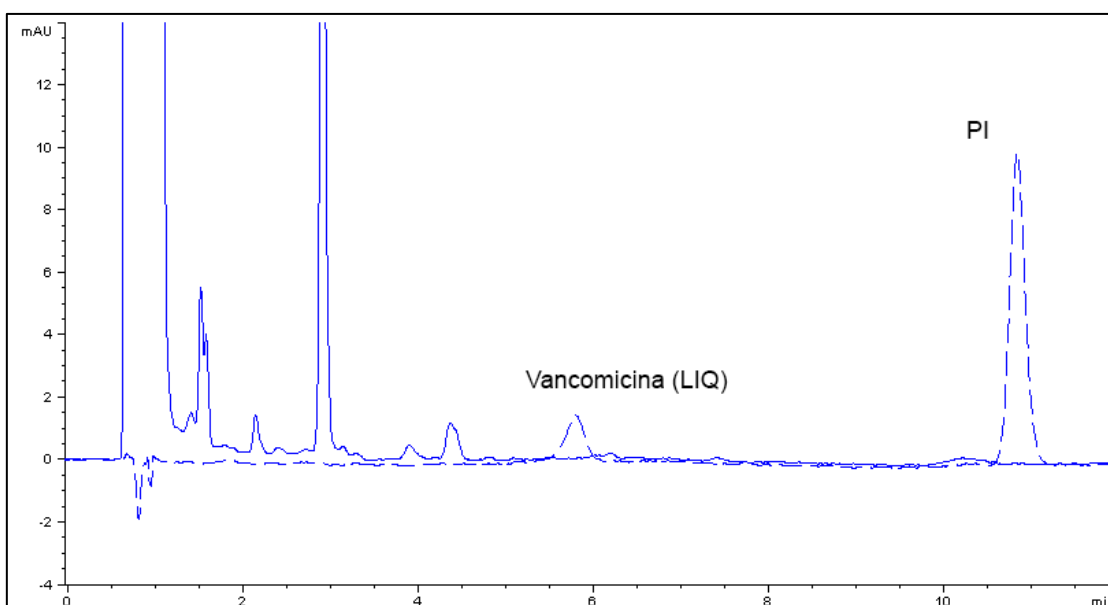


Figura 21 - Cromatograma obtido a partir do teste de Seletividade em Soro Hemolisado.
Dados: Esta figura sobrepõe os resultados cromatográficos obtidos com a matriz sem adição de PI e os resultados da análise do analito em concentração de LIQ (2 mg/L) e do padrão interno (10mg/L), - - analito em solução, — soro hemolisado. Fase móvel TFA 0.014%, 8% de ACN, fluxo de 2mL/min e temperatura controlada a 40°C.

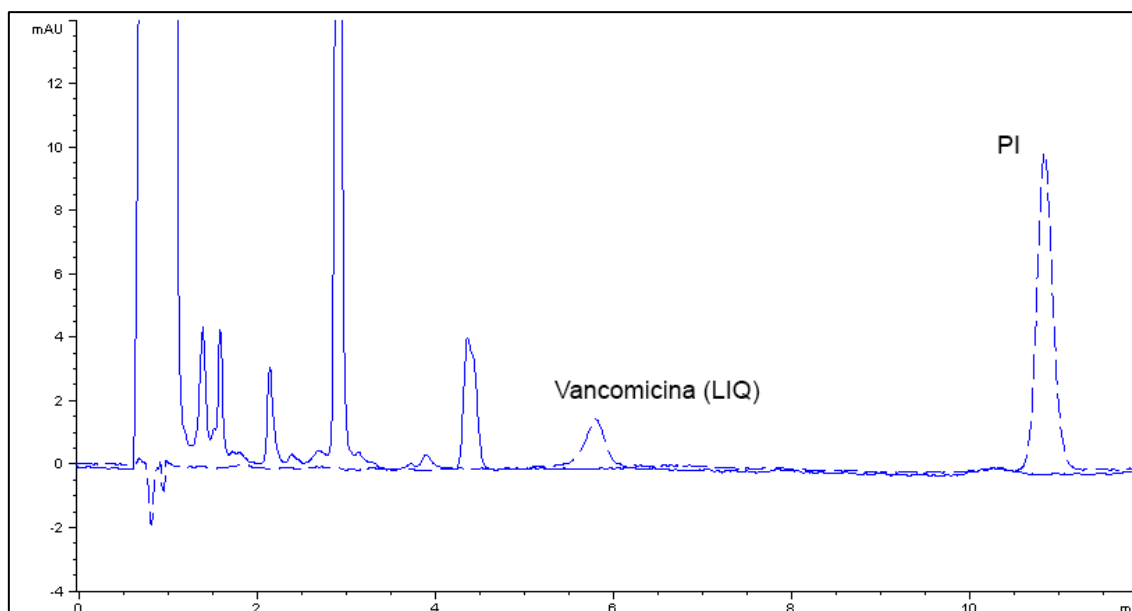


Figura 22 - Cromatograma obtido a partir do teste de Seletividade em Soro Lipêmico. Dados: Esta figura sobrepõe os resultados cromatográficos obtidos com a matriz sem adição de PI e os resultados da análise do analito em concentração de LIQ (2 mg/L) e do padrão interno (10mg/L), - - analito em solução, — soro lipêmico. Fase móvel TFA 0.014%, 8% de ACN, fluxo de 2mL/min e temperatura controlada a 40°C.

4.2.2 Limite de detecção e quantificação

O limite inferior de quantificação (2 mg/L) apresentou relação sinal-ruído sempre superior a 10 e precisão em conformidade com os parâmetros exigidos pela legislação vigente (CV inferior a 20%, testado em 3 replicatas em 3 dias diferentes). O limite de detecção (1 mg/L) apresentou relação sinal: ruído médio de 6 nos testes realizados (Tabela 6).

Tabela 6 - Limite de Quantificação e Detecção do método desenvolvido

Concentração Nominal (mg/L)	Relação Sinal Ruído média	Concentração Determinada (mg/L)	Desvio padrão (mg/L)	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%)
2 (LIQ)	12	1.7	0.12	10.08	9.61
1 (LD)	6	<2	-	-	-

O método apresentou boa sensibilidade considerando os valores esperados na monitorização sérica e comparável a outros autores que apresentaram metodologias de maior complexidade, como Bertolucci, (2007), cujo limite de quantificação foi de 1,5 mg/L, com um preparo de amostras envolvendo precipitação de proteínas, evaporação em fluxo de nitrogênio e volume de amostra maior. O mesmo procedimento foi aplicado por Santos *et al.* (2001) e Véra-López *et al.* (2007). Através de detecção por espectrometria de massas é possível obter um limite de quantificação muito mais baixo (1 ng/mL) (ABU-SHANDI, 2009), porém esta técnica exige equipamentos mais sofisticados para sua realização.

4.2.3 Linearidade

A linearidade foi testada conforme descrito no item 3.7.2. O método apresentou linearidade com o coeficiente de correlação (r) da curva padrão superior a 0,999, conforme exigido pela norma vigente. Aplicou-se a relação linear $Y=AX+B$ para obtenção da curva de calibração ao longo da faixa determinada de 2 a 70 mg/L (Figura 23). Níveis de precisão e exatidão satisfatórios com CV% e ER% inferiores a 15% em todos os pontos, conforme demonstrado na Tabela 7, adequados para a curva de calibração segundo a legislação aplicada a esta validação. A linearidade do método é suficiente para a monitorização terapêutica da droga, considerando as faixas de terapia aplicadas com relação ao nível de vale da droga que variam entre 5 e 20 mg/L (demonstrados na Tabela 1). Outros autores obtiveram faixas de linearidade maiores como Bertolucci, (2007) (1,5 a 100 mg/L) aplicando um processamento de amostra mais complexo e Tsai *et al.* (2010) (0,5-100 mg/L) aplicando detecção por espectrômetro de massas. Faixas de linearidade menores também são relatadas como 0,01-20 mg/L (SHIBATA, 2013) e 0,25-25 mg/L (BARANOWSKA *et al.* 2006).

Tabela 7 - Valores de Precisão e Exatidão Interdia Obtidos em Cada Nível de Concentração da Curva de Calibração de Linearidade da Vancomicina

Concentração nominal (mg/L)	Concentração determinada média (mg/L)	Desvio padrão (mg/L)	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%)
2	1,81	0,18	10,08	9,61
5	4,96	0,32	6,52	0,79
15	15,32	0,67	4,37	2,10
30	31,22	2,20	7,05	4,07
45	45,63	0,69	1,52	1,39
60	60,66	1,72	2,84	1,10
70	70,73	2,84	4,01	1,05

Dados: CV%, Coeficiente de variação; ER%, Erro relativo percentual.

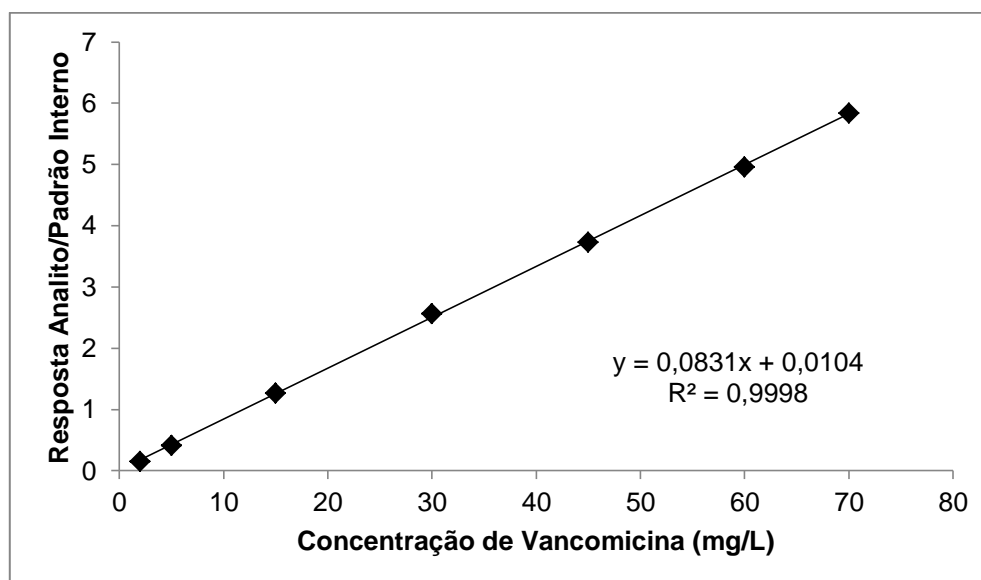


Figura 23 - Gráfico da Linearidade da Vancomicina obtido pelo método desenvolvido.

Dados: Gráfico obtido através de três curvas de calibração preparadas em soro, em triplicata e em sete níveis de concentração (2,5,15,30,45,60,70 mg/L). Equação da Reta, Coeficiente de Correlação e Gráfico da Linearidade da Vancomicina obtidos através da equação $Y=AX+B$ No eixo horizontal a concentração nominal das soluções preparadas. No eixo vertical a razão entre o sinal da vancomicina e o sinal do PI.

4.2.4 Efeito Residual

Os componentes de uma mistura possuem tempos variados de retenção na coluna. Eventualmente algum componente pode ficar retido tempo o suficiente para interferir na corrida subsequente e impactar a quantificação do analito ou PI, o que é conhecido como efeito residual (BRASIL, 2012).

O efeito residual foi avaliado após a leitura de soro branco e soro fortificado com vancomicina em concentração referente ao LSQ (70 mg/L) e subsequentemente duas amostras de matriz biológica sem o analito, conforme exigido pela legislação (BRASIL, 2012).

Não foi observado efeito residual nos testes conduzidos. Os cromatogramas subsequentes a eluição do LSQ nas condições de ensaio aplicadas não apresentaram qualquer pico adicional ao observado no cromatograma obtido na análise do soro branco original sem adição do analito (Figura 24), revelando que o método é aplicável a uma sequência de ensaios e o efeito residual relacionado ao próprio analito e demais elementos da matriz não está presente. O efeito residual na cromatografia não foi relatado por nenhuma das fontes consultadas.

4.2.5 Efeito Matriz

O efeito matriz diz respeito à variação da resposta quando diferentes composições de matriz biológica são aplicadas. A lipemia (excesso de lipídeos no sangue) e a hemólise (ruptura de hemácias) são variáveis pré-analíticas que podem impactar o resultado de um exame. Para avaliar estes efeitos a RDC 27/2012 propõe um teste para quantificar o efeito matriz e definir que tipo de amostras podem ser aferidas pelo método (BRASIL, 2012).

Para a definição do efeito matriz foram testadas amostras com soro normal, lipêmico e hemolísado, nas concentrações de 60 e 5 µg/mL (CQA e

CQB, respectivamente). Utilizou-se o cálculo do fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN) para estimar a variação do analito e do padrão interno nas diferentes matrizes. O CV% manteve-se inferior a 15% e de acordo com as exigências para a validação (Tabela 8). Com base nestes resultados é possível afirmar que mesmo amostras hemolisadas ou lipêmicas podem ser avaliadas por este método. Não foi descrita a ocorrência de efeito matriz nos trabalhos anteriores.

Tabela 8 - Variação do Fator de Matriz Normalizado por Padrão Interno (FMN) da Vancomicina Calculado para Avaliar o Efeito Matriz

Nível de concentração (mg/L)	FMN*	Média dos FMNs ± dp	FMNs (CV%)
5 (CQB)	1.10 ± 0,15	1.02 ± 0,13	12.86
60 (CQA)	0.94 ± 0,01		

Dados: *FMN, Fator de matriz normalizado por padrão interno calculado de acordo com a Equação 2. Para obtenção dos dados utilizaram-se resultados de CQA (60 mg/L) e CQB (5mg/L), em 4 amostras de fontes distintas de soro normal (não lipêmico, não hemolisado), 2 amostras de soro hemolisado e 2 amostras de soro lipêmico para cada concentração adicionadas de PI. Comparados com a média do resultado de 4 amostras de CQA e CQB em solução adicionado de PI.

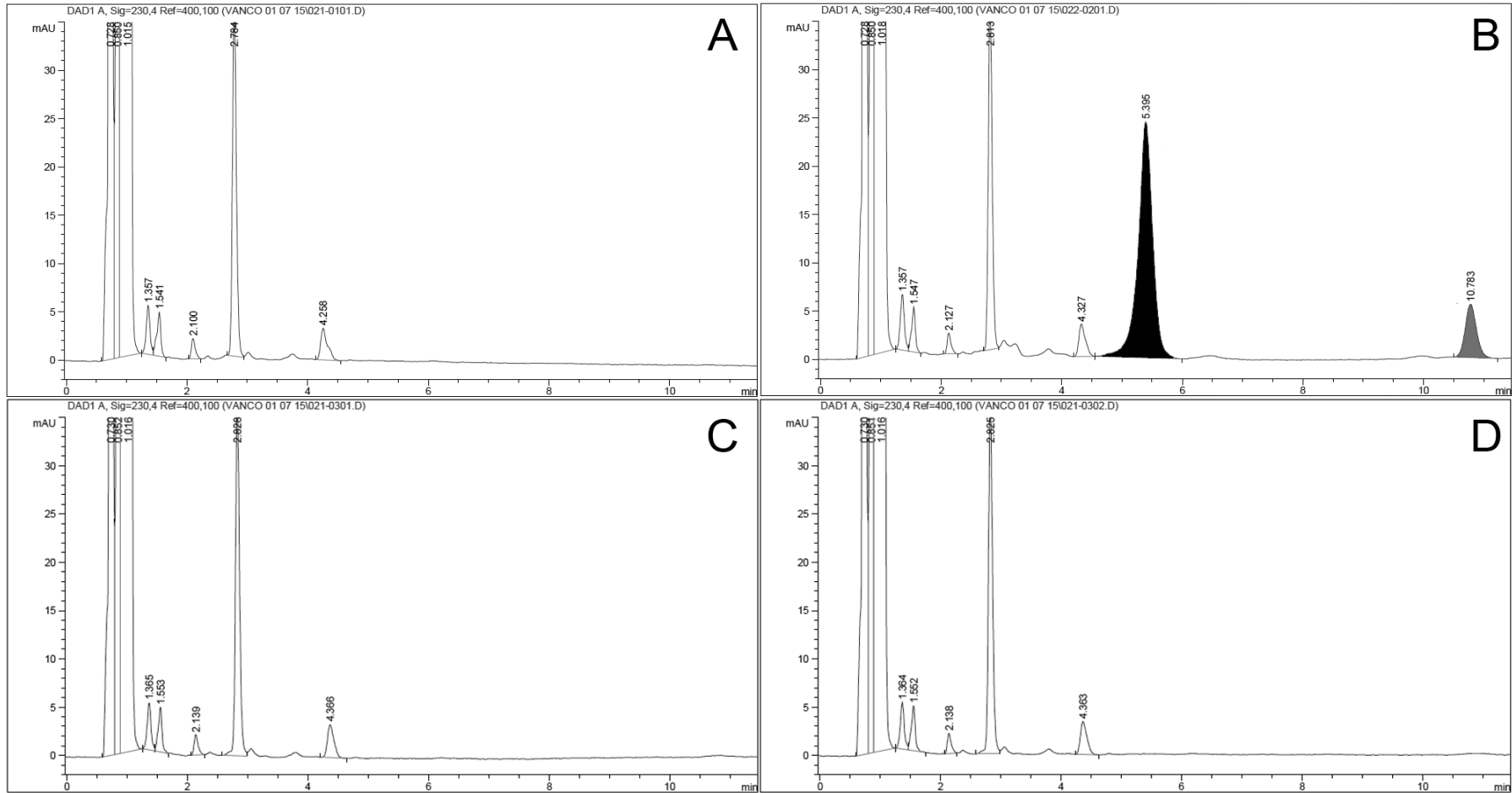


Figura 24 - Cromatogramas representativos do Teste de Efeito residual.

Dados: **A**, Cromatograma do branco antes da passagem do LSQ. **B** Cromatograma do LSQ, analito (em preto) e PI (em cinza) foram incorporados a matiz biológica para obter a concentração de 70 mg/L de vancomicina e 10 mg/L de PI e extraídos pelo método. **C**: primeiro branco após o LSQ. **D**: Segundo branco após o LSQ. O branco foi definido com aplicação de 100uL de soro sem a presença do analito ou PI e 25 uL de água seguido pelo processo de extração do método.

4.2.6 Precisão e Exatidão

Os parâmetros de precisão e exatidão foram avaliados pelo CV% e ER%, conforme descrito no item 3.7.6. Seus resultados satisfazem o limite de 15% exigido pela legislação em todas as concentrações testadas (Tabela 9). Foram utilizadas cinco amostras para cada uma das concentrações em cada um dos três dias de análise para definir a Exatidão e Precisão interdias. A precisão e exatidão intradia foi definida com cinco replicatas no primeiro dia de análise. A precisão média entre os 5 controles foi de 4,7% interdias e 2,6% intradias, e a exatidão interdias de 2,5% e intradia 3,7%. Os valores foram próximos aos relatados por outros autores que aplicaram o CLAE-UV/DAD como método de análise como Hosotsubo (1898) (CV% 4,8 interdia), López *et al* (2008) (CV% 2,40 intradia, ER% 3,37% intradia), Luksa *et al* (1995) (ER% 6,6% interdia e 11,7% intradia).

Tabela 9 - Resultados dos Controles de Precisão e Exatidão

Controle	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (ER%) Interdias	Exatidão (ER%) Intradia	Precisão (CV%) Interdias	Precisão (CV%) Intradia
CQ-LIQ	2	-4.27	0.27	9.23	7.81
CQB	5	3.32	9.42	4.40	4.88
CQM	30	4.04	1.33	4.35	0.73
CQA	60	-1.29	-2.44	2.94	1.02
CQD	83	1.42	1.46	7.16	3.78
[média]	-	2.52	3.67	4.71	2.60

4.2.7 Estabilidade

Os resultados dos testes de estabilidade foram satisfatórios em relação ao que é exigido pela legislação (ver item 3.7.7). Os resultados estão dispostos na Tabela 10. O método apresentou-se estável diante das condições esperadas para sua aplicação. A estabilidade da vancomicina foi descrita por

outros autores como Valle *et al* (2008) que demonstrou a estabilidade da vancomicina em matriz após 3 ciclos de descongelamento. Segundo a *American Medical Association*, as soluções de vancomicina são estáveis por, no mínimo, 2 semanas em temperatura ambiente e por no mínimo 63 dias em refrigeração (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2015; USA NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2016). Os resultados obtidos estão de acordo com o que foi descrito em literatura. A maior variação encontrada foi no período pós-processamento. No entanto, ainda se distribuiu dentro da variação permitida por legislação.

Tabela 10 - Ensaio de Estabilidade

Estabilidades		Nível de concentração testado 5 mg/L	Nível de concentração testado 60 mg/L
Solução em bancada (4 horas) Temp. Ambiente*	Concentração determinada (mg/L ± dp)	5,0 ± 0,1	59,6 ± 0,9
	CV (%)	2.89	1.49
	EPR (%)	+0.27	-0,62
Solução em Refrigeração por 2 dias (4°C)*	Concentração determinada (mg/L ± dp)	5.1 ± 0,1	58,5 ± 1,6
	CV (%)	2.88	2.83
	EPR (%)	+1.07	-6,17
Curta duração (8h) Temp. Ambiente**	Concentração determinada (mg/L ± dp)	4.7 ± 0,6	59.8 ± 6,4
	CV (%)	12.41	10.69
	EPR (%)	-6.49	-0.32
Pós-processamento (5h) Temp. Ambiente**	Concentração determinada (mg/L ± dp)	4.7 ± 0,5	51.6 ± 1,0
	CV (%)	9.95	1,97
	EPR (%)	-6,82	-13,99
3 Ciclos de descongelamento (24h)**	Concentração determinada (mg/L ± dp)	5.3 ± 0,1	58,5 ± 1.4
	CV (%)	+2,37	2.34
	EPR (%)	6,38	-2.58
Longa duração (20 dias) (-40 °C)**	Concentração determinada (mg/L ± dp)	5.26 ± 0,4	56,1 ± 0,8
	CV (%)	7,84	1.51
	EPR (%)	+5,29	-6.48

Dados: * Solução , ** Matriz,

O presente método foi desenvolvido e validado conforme as exigências da resolução RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA e a partir deste trabalho foi elaborado um artigo (Anexo B). Esta técnica apresentou como principais vantagens o menor volume de amostra exigido, o processo de extração simplificado, a faixa de linearidade adequada ao monitoramento de níveis de vale de vancomicina e resultados satisfatórios com relação a precisão, exatidão, estabilidade e seletividade. Outros métodos apresentaram faixas de linearidade superiores, porém com preparo de amostra mais complexo e maior exigência de volume de amostra.

4.3 PROTOCOLO DE MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA

O protocolo hospitalar para a monitorização terapêutica da vancomicina consiste de 4 processos principais: definir quais os pacientes devem realizar este monitoramento, operacionalizar a coleta das amostras, definir qual o alvo terapêutico da concentração e quais as medidas de ajuste para a dose. O protocolo completo, em seu formato de uso hospitalar pode ser consultado no anexo D.

4.3.1 Indicação de Monitoramento

A monitorização proposta ao hospital deve iniciar apenas com o grupo restrito e posteriormente estender o acesso aos demais pacientes. Foram escolhidos os pacientes da UTI neonatal com diagnóstico de infecção por MRSA.

Estes pacientes apresentam variações rápidas e intermitentes em sua fisiologia e *clearance* renal que causam alterações na farmacocinética da vancomicina e justificam o seu monitoramento terapêutico (FEFERBAUM *et al.* 2001). Além disto são atendidos por uma equipe profissional restrita e compartilham o mesmo espaço no hospital, tornando o monitoramento das

doses e tempos de coleta menos complexo. Como os recém-nascidos apresentam as características de mudança rápida de distribuição de líquidos. Esse fator faz com que se torne mais difícil atingir as concentrações séricas adequadas para o tratamento, estando os pacientes mais sujeitos a desenvolver níveis tóxicos e subterapêuticos do fármaco (HAMMET-STABLER;JOHNS, 1998).

Estudos mostram que entre os recém nascidos a taxa de níveis subterapêuticos é alta. Grimsley e Thompson (1999) relatam 30% de níveis basais inferiores a 5 mg/L em uma população de 70 recém nascidos. Tan et al (2002), relatam que apenas 47% de 101 recém-nascidos prematuros atingiram os níveis terapêuticos propostos de 5 a 10 mg/L. Segundo o consenso da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) devem ser monitorados todos os pacientes que recebem esquema de tratamento com doses altas de vancomicina, utilizam outras drogas nefrotóxicas concomitantes, com função renal instável e pacientes que recebem tratamento com a droga por mais de 3 dias (RYBAK *et al.* 2009).

4.3.2 Fluxo de Amostras para Análise

O fluxo de coleta e transporte de amostras para análise foi definido em conjunto com os profissionais da Núcleo de Pesquisa Clínica do Hospital Pequeno Príncipe (NUPE-HPP), e foi planejado de forma a operacionalizar os horários de coleta e análise das amostras e a entrega dos resultados (Figura 25).

As amostras devem ser coletadas dentre os pacientes selecionados em dias da semana pré-estabelecidos por volta das 12h, horário padrão para a administração da vancomicina no hospital, em até 30 minutos antes da administração da próxima dose para caracterizar o nível de base. As amostras são então enviadas ao laboratório onde são acondicionadas sob refrigeração (4°C) até serem analisadas. Posteriormente, o resultado da análise é enviado ao setor solicitante.

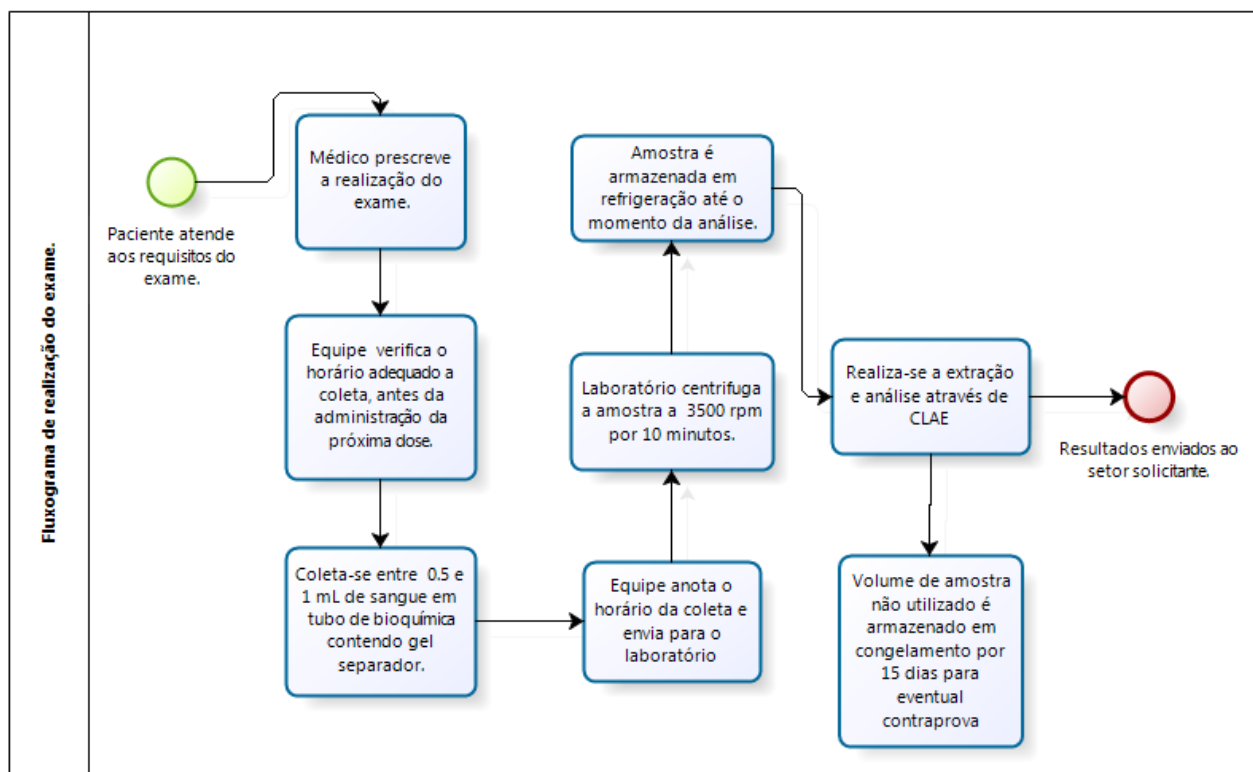


Figura 25 - Fluxograma de realização do exame. Fonte: Autoria Própria

4.3.3 Definição dos Níveis Terapêuticos de Vancomicina

O nível terapêutico mais referido na literatura para crianças e neonatos é de 5 a 10 mg/L (YOUNG, 2012; TAN *et al.* 2002; SAUGEL *et al.* 2013, LAVOIE *et al.* 2013). Porém diversos autores descrevem alvos terapêuticos diferenciados tais como 6 a 10 mg/L (ROCHA; ALMEIDA; FALCÃO, 2006), 7 a 10 mg/L (FRYMOYER; GUGLIELMO; HERSH, 2013) 10 a 20 mg/L (GOMEZ *et al.* 2013), 5 a 15 mg/L (ONG; NICOLAU; 2004, MCKAMY *et al.* 2011), e até mesmo de 15 a 20 mg/L (YOUNG, 2012),

Artigos mais recentes propõem um regime terapêutico mais agressivo, OUDIN *et al.* (2011) propõem o alvo terapêutico para os neonatos e crianças pequenas de 10 a 30 mg/L utilizando infusão contínua. JACQZ-AIGRAIN *et al.* (2013) relatam que o nível terapêutico deve estar acima de 10 mg/L para otimizar a eficiência e reduzir o risco de resistência. Segundo estes autores o alvo terapêutico deve estar entre 10-15 mg/L para o tratamento de

microorganismos susceptíveis e entre 15-20 mg/L contra cepas menos sensíveis ao antibiótico.

A tendência de aumento do alvo terapêutico se deu como resultado das novas recomendações do consenso da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas em 2009, que propôs um aumento das doses administradas devido ao relativo aumento das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) das cepas de MRSA frente à vancomicina (RYBAK *et al.* 2009), fenômeno que ficou conhecido na literatura como CIM “Creep” (JACQZ-AIGRAIN, 2013). A IDSA propõe o nível terapêutico 15-20 mg/L para adultos, mas sem indicações específicas para os recém natos (RYBAK *et al.* 2009). Porém esta recomendação é contestada por alguns estudos por conta da toxicidade renal.

PRITCHARD *et al* (2010), em um estudo retrospectivo de 2493 casos, associaram a nefrotoxicidade ao alvo terapêutico mais alto e tempo prolongado de tratamento. JEFFRES *et al* (2007), relacionaram o nível basal de vancomicina de 15 mg/L a ocorrência de nefrotoxicidade.

A literatura não apresenta um consenso com relação aos níveis terapêuticos da vancomicina, porém, após considerar a literatura disponível, em consenso com profissionais do hospital, decidiu-se adotar os níveis séricos basais de 10 a 20 mg/L como sendo adequados para esta pesquisa (Tabela 11). Desta forma, mantém-se a concentração da droga acima dos 10 mg/L que, segundo a IDSA, pode ser considerado um limiar de resistência bacteriana.

Entre o intervalo de 15-20 mg/L, devido ao maior risco de desenvolvimento de nefrotoxicidade, é feito um acompanhamento mais intensivo da função renal dos pacientes, com avaliação de *clearance* de creatinina a cada 48 horas. Acima de 20mg/L a dose é reduzida para tentar atingir os níveis adequados.

O nível de 30 mg/L foi definido como limiar de dose tóxica (MACHADO *et al.* 2001) e a exemplo de outros protocolos hospitalares consultados (FEHMIG, 2012; HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN, 2012) caso a concentração no soro se apresente superior a este limiar deve-se considerar a substituição da droga para evitar maiores riscos ao paciente.

4.3.4 Ajuste de Dose

Uma vez detectados os níveis séricos alterados, é necessário corrigir a posologia da droga. A literatura demonstra duas abordagens para este ajuste, a alteração da quantidade de droga aplicada em cada infusão e a alteração do intervalo entre as infusões (TOBIN *et al.* 2002).

O intervalo e a quantidade de droga dependem da função renal do paciente, devido ao tempo de depuração da droga estar diretamente ligado a este parâmetro (YOSHIDA *et al.* 2005). Em neonatologia a farmacocinética também pode variar conforme a idade gestacional do recém-nascido (JACQZ-AINGRAIN, 2013). Dentre os protocolos hospitalares consultados predomina a alteração do intervalo de dose como medida de ajuste (Tabela 1). A alteração do intervalo de dose permite ajustar a terapia aos pacientes que eliminam a droga mais lenta ou mais rapidamente, com menor risco de exposição a níveis excessivos.

O ajuste de dose sugerido por este estudo (Tabela 11), prioriza a alteração do intervalo de doses como primeira medida para atingir os níveis séricos adequados, caso este ajuste não seja possível ou seja insuficiente a dose pode ser aumentada ou diminuída.

Tabela 11 - Recomendações de ajuste de dose com base nos níveis de vancomicina

Resultado da dosagem sérica (mg/L)	Ação sobre a vancomicina	Observação
< 10	Diminuir o intervalo entre doses	Ex.: se 8/8h passar para 6/6h. Se não for possível alterar o aprazamento aumentar a dose.
10 - 15 (alvo esperado)	Manter dose	
15 a 20	Manter dose	Monitorar a creatinina a cada 48 horas
>20 até 30	Aumenta o intervalo entre doses	Ex.: se 8/8h passa para 12/12h. e Monitorar a creatinina a cada 48 horas
>30	Suspender a Vancomicina	Substituir por linezolida
Após todos os ajustes realizados a partir do resultado da vancocinemia, deve-se coletar nova amostra de sangue após 24h.		

Fonte: Autoria Própria.

4.4 AVALIAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS DE PACIENTES

Para definir a aplicabilidade do método analítico em amostras reais foram realizadas coletas de pacientes em uso de vancomicina. Os participantes do estudo foram tratados conforme o esquema de doses descrito na Tabela 12.

Tabela 12 - Doses recomendadas de vancomicina de acordo com o agente e a CIM

Situação de uso	CIM	Dose (mg/kg)	Intervalo	Observação
Empírico	-	10	8	
Estafilococos não produtor de coagulase	1	10	8	
Estafilococos não produtor de coagulase	≥ 2	15	8	Monitorar a creatinina a cada 48 horas
MRSA	0,5	10	8	
MRSA	1	15	8	Monitorar a creatinina a cada 48 horas
MRSA	≥ 2	-	-	Tratamento com Linezolida

Fonte: Protocolo interno HPP, 2015.

Ao todo foram colhidas 19 amostras de 10 pacientes, cada amostra foi testada em triplicata pelo método, dois destes resultados foram excluídos da análise final devido a coleta ter sido realizada após o início da infusão do fármaco. A idade dos pacientes variou entre 10 e 93 dias de vida, entre os 10 pacientes incluídos, 6 eram recém nascidos pré-termo (entre 26 e 33 semanas) e 4 eram recém nascidos a termo. O tempo de tratamento com vancomicina variou de 6 a 20 dias. Não foram consideradas as variações na distribuição ou depuração da droga entre os pacientes na aplicação do protocolo clínico para este estudo.

Os resultados destas análises podem ser verificados na Tabela 13. O CV% entre as triplicatas manteve-se abaixo de 15% em todos os testes. Os resultados obtidos foram condizentes com o esperado para os pacientes analisados e não foram detectados interferentes de outras substâncias no tempo de retenção da vancomicina e do PI em nenhuma das análises realizadas (Figura 26).

Tabela 13 - Resultados de Dosagem de Pacientes

Identificador da Amostra*	Dose (mg/kg)	Intervalo entre doses (horas)	Dose diária (mg/kg/dia)	CC (mg/dL)	Nível Basal (NB) vancomicina (mg/L)**	CV%***
A1	10	8	30	148,5	5,8	3,8
A2	10	6	40	74,3	11,9	7,5
B1	15	8	45	96,8	21,7	6,8
B2	15	12	30	96,8	5,9	3,7
C1	10	8	30	79,2	13,8	7
D1	15	12	30	71	7,9	4,2
D2	15	8	45	71	8,4	3,9
E1	10	8	30	72,6	5,7	4,8
E2	15	6	60	155,1	17,3	4,2
F1	15	12	30	72,6	6	3,2
F2	15	8	45	72,6	11,3	1,5
G1	15	12	30	57,8	6,1	0,6
G2	15	8	45	57,8	13,7	3,7
H1	15	8	45	32,2	31,7	2,5
I1	15	8	45	78	8,2	2,2
I2	10	8	30	73,5	11,5	3,5
J1	15	8	45	58,5	9,2	2,3

Dados: Resultados obtidos a partir das amostras de participantes analisadas pelo método validado neste trabalho, informações de dose, intervalo e *clearance* de creatinina (CC), foram obtidas através de consulta em prontuários,

* Cada participante foi identificado através de uma letra (A,B,C...) para preservar a identidade do mesmo e um número que representa a ordem cronológica do teste (1 para 1ª amostra, 2 para 2ª amostra).

** Representa a média aritmética do resultado da análise em triplicata.

*** CV% foi obtido através do resultado em triplicata da análise através da equação descrita no item 2.5.7.

Os resultados individuais de nível basal (NB) de vancomicina obtidos através do método estão também demonstrados na Figura 26. A maior parte dos resultados se distribuíram entre 5 e 15 mg/L, valores esperados perante os parâmetros de dose aplicados a terapia (Tabela 12) e de acordo com os artigos consultados (BROOME; SO, 2011; KIM *et al.* 2010)

Dos 10 pacientes incluídos, 7 iniciaram o tratamento com o esquema de dose de 30 mg/kg/dia. Dentre estes, 6 pacientes obtiveram NB entre 5-10 mg/L (A, B, D, E, F, G, H) e apenas 1 paciente obteve o NB proposto pelo protocolo entre 10-15 mg/L (C). Tal resultado corrobora os valores encontrados em literatura, que mostram que na maior parte dos casos a dose inicial tipicamente administrada é insuficiente para atingir os níveis terapêuticos sugeridos pela IDSA de 10 a 20 mg/L (HOANG *et al.* 2014). Kim *et al* (2010) em estudo com 309 crianças tratadas com vancomicina, mostraram que com a dose inicial de 40 mg/kg/dia apenas 14% dos pacientes atingiram NB acima de 10 mg/L. Estes resultados sugerem que uma nova abordagem é necessária para o tratamento empírico com vancomicina.

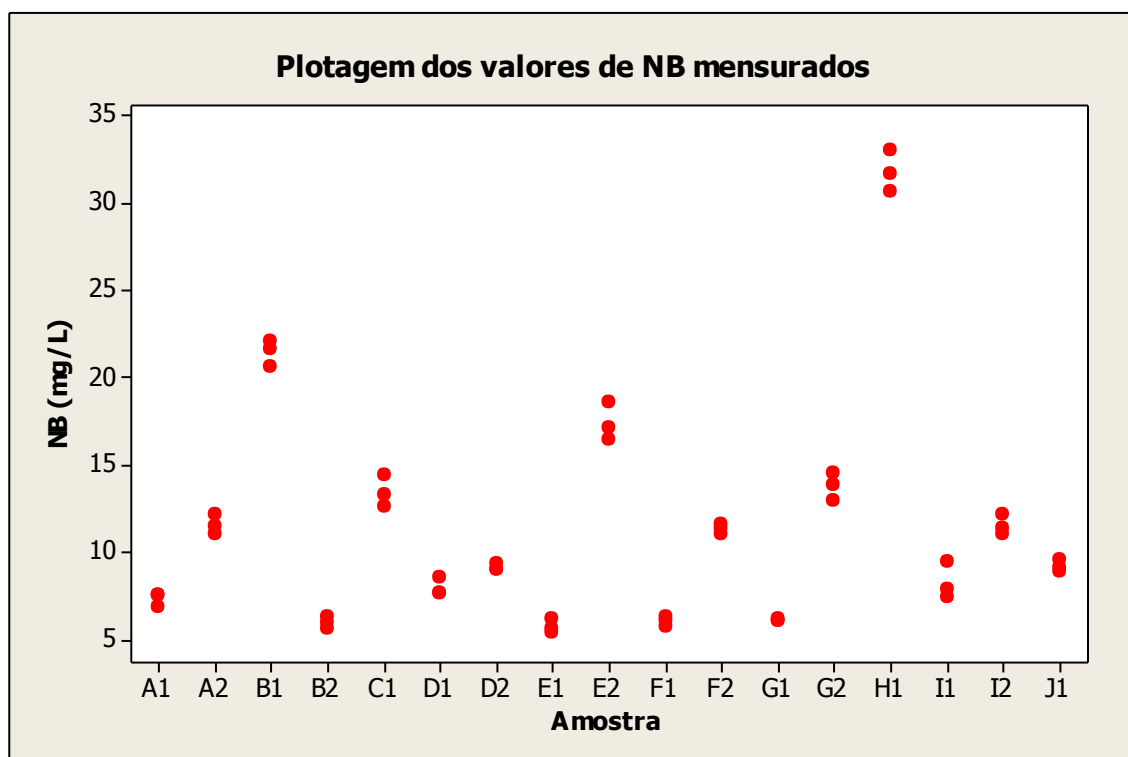


Figura 26 - Plotagem de valores individuais de concentração mensurados. Dados: Análise por CLAE-DAD com a metodologia proposta por este estudo. Cada paciente foi identificado com uma letra (A,B,C,D,E,F,G,H) seguida por um número que indica a primeira amostra (1) ou a segunda amostra (2). Foram excluídos desta figura duas amostras que foram coletadas após a administração do fármaco (E0 e K0).

Neste estudo dois dos pacientes (B1 e H1) que iniciaram o tratamento com 45 mg/kg/dia obtiveram um NB superior a 20 mg/L, que é o limiar superior para esta terapia, o que sugere que começar o tratamento com doses mais altas, embora tenha sido inferido por alguns autores como Frymoyer *et al.* (2011) e

Kim *et al.* (2010), pode representar um aumento no risco de toxicidade com vancomicina, especialmente se o monitoramento terapêutico não for realizado. Contudo, são necessários estudos com maior número de pacientes para determinar até que ponto o aumento da dose inicial pode causar um aumento de toxicidade. Com relação ao NB, no entanto, já existem mais evidências descritas por Pritchard *et al.* (2010), Bosso *et al.* (2011), van Hal, Paterson e Lodise (2013) que demonstram que NB entre 15 e 20 mg/L representam um aumento significativo no risco de nefrotoxicidade.

Dentre os 7 pacientes cujo NB foi inferior a 10 mg/L na primeira amostra, a posologia foi ajustada em 6 pacientes, dentre estes, 5 obtiveram níveis de dose adequados entre 10-15 mg/L na amostra colhida após o ajuste. Tais resultados demonstram a importância da determinação do NB para a terapia dos pacientes e demonstram também a aplicabilidade da técnica em amostras reais. Estes resultados encontram-se em ressonância com os encontrados na literatura quanto a aplicabilidade do CLAE para monitorização do NB de vancomicina (SANTOS *et al.* 2001; VALLE *et al.* 2008; GÓMEZ *et al.* 2013) e a importância da realização da monitorização terapêutica da vancomicina (KIM *et al.* 2010; RYBAK *et al.* 2009; JACQZ-AIGRAIN, *et al.* 2013).

Um obstáculo a ser considerado com relação à interpretação e coleta para este exame é a janela de tempo. Em um universo restrito de 10 pacientes e 19 amostras, duas coletas foram realizadas fora do prazo adequado (após o início da infusão do fármaco), resultando em valores muito elevados (50,5 e 35,0 mg/L) em relação ao NB e as amostras foram excluídas da análise final, cuja interpretação poderia levar a ajuste inadequado da terapia. Portanto, é considerável a possibilidade de erros na coleta deste exame, problema também apontado por Morrison *et al.* (2012) em cujo trabalho destacou-se uma proporção de 41,3% de coletas realizadas antes do tempo adequado. Tais erros devem ser prevenidos através de treinamento da equipe de coleta com relação a este exame.

Todos os pacientes tratados com o protocolo de doses descrito neste estudo obtiveram cura clínica ao final do tratamento e nenhum paciente desenvolveu piora da função renal durante o período de estudo.

4.5 PERSPECTIVAS E ESTUDOS FUTUROS

Através da implantação da monitorização terapêutica da vancomicina no hospital será possível prevenir que pacientes sejam expostos a níveis tóxicos de vancomicina por períodos prolongados e auxiliar no ajuste de dose evitando níveis subterapêuticos (RYBAK *et al.* 2009). Estudos de monitorização terapêutica com maior número de participantes e acompanhando os pacientes por um período mais longo de tempo são necessários avaliar fatores como a redução do tempo de internamento, redução dos custos de tratamento (evitando escalonar o tratamento para outros antibióticos e por períodos prolongados), redução de casos de toxicidade renal e aumento da efetividade do tratamento.

Um possível desdobramento deste trabalho será a avaliação farmacocinética e farmacodinâmica da vancomicina em diferentes perfis de pacientes e frente a diferentes isolados, como o *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sp.* não produtores de coagulase (GIULIANO; KRYSTAL; HALL, 2010). Estudos como estes entraram em curso no hospital após o término desta pesquisa. Também será aplicável individualizar a terapia através da adequação das doses para pacientes com condições clínicas que afetam a distribuição da vancomicina, como os pacientes com queimaduras tal como proposto por Gomez *et al.* (2013) outras condições como obesidade (HALL *et al.* 2008), edema e disfunção renal como proposto por Yoshida *et al.* (2005) e no caso específico dos neonatos a abordagem de doses diferenciadas conforme a idade gestacional (VANDENDRIESSCHE *et al.* 2014).

5. CONCLUSÃO

Foi desenvolvida uma metodologia analítica através de CLAE-DAD para determinação de vancomicina sérica, adequada à monitorização terapêutica em UTI neonatal. A metodologia foi validada conforme a norma RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. O método desenvolvido apresenta vantagem em relação a outros publicados por estar de acordo com a norma vigente, ser simplificado, rápido e exigir um volume de amostra reduzido para sua realização. Os parâmetros de validação indicaram que o método é sensível, seletivo, linear, estável, preciso e exato. Foi desenvolvido e aplicado um fluxo para coleta e análise de amostras e um protocolo para avaliação e ajustes de doses.

O presente método foi testado em pacientes reais e apresentou resultados satisfatórios, com ausência de interferentes cromatográficos e valores mensurados compatíveis com o previsto pelo modelo de terapia aplicado. No entanto, são necessários estudos com maior número de participantes para avaliar a sua eficácia e segurança do protocolo proposto na terapia antimicrobiana. Os resultados deste estudo indicam que as doses empíricas atualmente aplicadas à terapia foram insuficientes para atingir os níveis terapêuticos recomendados pela literatura e devem ser complementados com a monitorização sérica para sua adequação.

A implementação da monitorização terapêutica da vancomicina no hospital poderá propiciar uma maior segurança e eficácia ao tratamento com o glicopeptídeo. Proporcionará a possibilidade de mais estudos avaliando a farmacocinética e farmacodinâmica, individualização dos regimes de tratamento e estudos para avaliar os resultados da implementação do protocolo em termos de diminuição do tempo de internamento, diminuição da toxicidade renal da terapia e eficiência do tratamento com vancomicina.

REFERÊNCIAS

ABU-SHANDI, K. H. Determination of vancomycin in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 395, n. 2, p. 527-32, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19655128>>. Acesso em: 17/7/2014.

AMERICAN SOCIETY OF HEALTH SYSTEM PHARMACISTS; AHFS Drug Information 2009. Bethesda, MD. (2009), p. 485.

AHSMAN, M. J.; WILDSCHUT, E. D.; TIBBOEL, D.; MATHOT, R. A. Microanalysis of beta-lactam antibiotics and vancomycin in plasma for pharmacokinetic studies in neonates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 75-80, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2612158&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17/10/2013.

ANDERSON, B. J.; ALLEGAERT, K.; VAN DEN ANKER, J. N.; COSSEY, V.; HOLFORD, N. H. G. Vancomycin pharmacokinetics in preterm neonates and the prediction of adult clearance. **British journal of clinical pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 75-84, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2000709&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21/10/2013.

BARANOWSKA, I.; MARKOWSKI, P.; BARANOWSKI, J. Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method. **Analytica Chimica acta**, v. 570, n. 1, p. 46-58, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267006007707>>. Acesso em: 16/12/2013.

BARANOWSKA, I.; WILCZEK, A.; BARANOWSKI, J. Rapid UHPLC method for simultaneous determination of vancomycin, terbinafine, spironolactone, furosemide and their metabolites: application to human plasma and urine. **Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 755-9, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631435>>. Acesso em: 21/7/2014.

BEGG, E. J.; BARCLAY, M. L.; KIRKPATRICK, C. J. The therapeutic monitoring of antimicrobial agents. **British journal of clinical pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 23-30, jan. 1999.

BERTOLUCI, D. F. F. **Uso da vancomicina nas infecções por Staphylococcus aureus e epidermides em pacientes queimados: monitoramento das concentrações plasmáticas após infusão intermitente**. 2007. 102f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2007

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Re n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 junho 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 27, de 17 de maio de 2012. 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 República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 maio 2012.

BROOME, L.; SO, T.-Y. An evaluation of initial vancomycin dosing in infants, children, and adolescents. **International journal of pediatrics**, v. 2011, p. 470364, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3199208&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17/10/2013.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. 1821 p.

CHENG, C.; LIU, S.; XIAO, D.; et al. LC-MS/MS method development and validation for the determination of polymyxins and vancomycin in rat plasma. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 878, n. 28, p. 2831-8, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023210005350>>. Acesso em: 17/7/2014.

CONROY, S.; MCINTYRE, J. The use of unlicensed and off-label medicines in the neonate. **Seminars in fetal & neonatal medicine**, v. 10, n. 2, p. 115-22, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15701577>>. Acesso em: 21/10/2013.

DE VRIESE, A. S.; VANDECASTEELE, S. J. VANCOMYCIN: The Tale Of The Vanquisher And The Pyrrhic Victory. **Peritoneal Dialysis International**, v. 34, n. 2, p. 154-61, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3968100&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/10/2015.

DIANA, J.; VISKY, D.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Development and validation of an improved method for the analysis of vancomycin by liquid chromatography selectivity of reversed-phase columns towards vancomycin components. **Journal of chromatography. A**, v. 996, n. 1-2, p. 115-31, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12830913>>.

DOAN J. A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection. Ace HPLC Columns. Disponível em: http://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_BufferSelection.pdf Acesso em: 15/05/2015

FAVETTA, P.; GUITTON, J.; BLEYZAC, N.; DUFRESNE, C.; BUREAU, J. New sensitive assay of vancomycin in human plasma using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 751, n. 2, p. 377-382, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434700004849>>. Acesso em: 17/7/2014.

FEFERBAUM, R.; KOBOL MACHADO, J. K.; ALBUQUERQUE DINIZ, E. M. DE; et al. Vancomycin monitoring in term newborns: comparison of peak and trough serum concentrations determined by high performance liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassay. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 56, n. 5, p. 149-52. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781595>>. Acesso em: 12/2/2014.

FHEMIG. Sepsis Neonatal. Protocolos Clínicos. Brazil; 2012. p. 25-7. Disponível em: <<http://www.fhemig.mg.gov.br/pt/protocolos-clinicos>>. Acesso em: 17/10/2013

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Vancomycin Solubility Study*. Fev, 2008. Disponível em: <http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-drugs-gen/documents/document/ucm082291.pdf>. Acesso em: 13/12/2015.

FRYMOYER, A.; GUGLIELMO, B. J.; HERSH, A. L. Desired vancomycin trough serum concentration for treating invasive methicillin-resistant Staphylococcal infections. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 10, p. 1077-9, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652479>>. Acesso em: 10/2/2014.

GASPARETTO, J. C. **Avaliação da Biodisponibilidade dos principais metabólitos secundários do guaco a partir da forma farmacêutica xarope**. 2013. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná., Curitiba, PR.

GARNER, David; **Microbiology Nuts & Bolts: Key Concepts of Microbiology & Infection**. 2^a ed. CreateSpace Independent Publishing Platform, 2013

GIULIANO, C.; GIULIANO, C.; HAASE, K. K.; HALL, R. Use of vancomycin pharmacokinetic-pharmacodynamic properties in the treatment of MRSA infections. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 1, p. 95–106, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2877625&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25/8/2015.

GOMEZ, D. S.; CAMPOS, E. V; AZEVEDO, R. P. DE; et al. Individualised vancomycin doses for paediatric burn patients to achieve PK/PD targets. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 39, n. 3, p.

445-50, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22867735>>. Acesso em: 17/10/2013.

GRIMSLEY, C.; THOMSON, A. H. Pharmacokinetics and dose requirements of vancomycin in neonates. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 81, n. 3, p. F221-7, nov. 1999.

HALL, R. G.; PAYNE, K. D.; BAIN, A. M.; et al. Multicenter evaluation of vancomycin dosing: emphasis on obesity. **The American journal of medicine**, v. 121, n. 6, p. 515-8, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2577897&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17/4/2016.

HAGIHARA, M.; SUTHERLAND, C.; NICOLAU, D. P. Development of HPLC methods for the determination of vancomycin in human plasma, mouse serum and bronchoalveolar lavage fluid. **Journal of chromatographic science**, v. 51, n. 3, p. 201-7, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22851425>>. Acesso em: 17/7/2014.

HAMMETT-STABLER, C.; JOHNS, T. Laboratory guidelines for monitoring of antimicrobial drugs. **Clinical chemistry**, v. 1140, p. 1129-1140, 1998. Disponível em: <<http://www.clinchem.org/content/44/5/1129.short>>. Acesso em: 21/10/2013.

HAZLEWOOD, K. A.; BROUSE, S. D.; PITCHER, W. D.; HALL, R. G. Vancomycin-associated nephrotoxicity: grave concern or death by character assassination? **The American Journal Of Medicine**, v. 123, n. 2, p. 182.e1-7, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2813201&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17/10/2013.

HOANG, J.; DERSCH-MILLS, D.; BRESEE, L.; KRAFT, T.; VANDERKOOI, O. G. Achieving therapeutic vancomycin levels in pediatric patients. **The Canadian journal of hospital pharmacy**, v. 67, n. 6, p. 416-22, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4275137&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23/8/2015.

HOLMES, N. E.; TURNIDGE, J. D.; MUNCKHOF, W. J.; et al. Vancomycin AUC/MIC ratio and 30-day mortality in patients with Staphylococcus aureus bacteremia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1654-63, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3623342&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13/2/2014.

HOOG, M. DE; MOUTON, J. W.; ANKER, J. N. VAN DEN. Vancomycin: pharmacokinetics and administration regimens in neonates. **Clinical pharmacokinetics**, v. 43, n. 7, p. 417-40, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15139793>>. Acesso em 17/10/2013

HOSOTSUBO, H. Rapid and specific method for the determination of vancomycin in plasma by high-performance liquid chromatography on an aminopropyl column. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 487, p. 421-427, 1989. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434700830492>>. Acesso em: 21/7/2014.

HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN. Protocolo para Controle de Vancocinemia. v03. 2015. Disponível em: http://medsv1.einstein.br/diretrizes/terapia_intensiva/protocolo_vancocinemia.pdf. Acesso em 07/12/2015

HU, L.-Q.; YIN, C.-L.; DU, Y.-H.; ZENG, Z.-P. Simultaneous and Direct Determination of Vancomycin and Cephalexin in Human Plasma by Using HPLC-DAD Coupled with Second-Order Calibration Algorithms. **Journal of analytical methods in chemistry**, v. 2012, p. 256963, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3346993&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17/7/2014.

INMAN, E. L. Determination of vancomycin related substances by gradient high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 410, p. 363-372, 1987. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967300900669>>. Acesso em: 17/7/2014.

JACQZ-AIGRAIN, E.; ZHAO, W.; SHARLAND, M.; ANKER, J. N. VAN DEN. Use of antibacterial agents in the neonate: 50 years of experience with vancomycin administration. **Seminars in fetal & neonatal medicine**, v. 18, n. 1, p. 28-34, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23137927>>. Acesso em: 17/10/2013.

JEFFRES MN, ISAKOW W, DOHERTY JA, MICEK ST, KOLLEF MH.. A retrospective analysis of possible renal toxicity associated with vancomycin in patients with health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. **Clin Ther**. 2007;29:1107-1115. 13. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17692725>> Aceso em 13/10/2015

JEHL, F.; GALLION, C.; THIERRY, R. C.; MONTEIL, H. Determination of Vancomycin in Human Serum by High-Pressure Liquid Chromatography. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 27, n. 4, 1985. Acesso em 17/10/2013.

JESÚS VALLE, M. J. DE; LÓPEZ, F. G.; NAVARRO, A. S. Development and validation of an HPLC method for vancomycin and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 48, n. 3, p. 835-9, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18639406>>. Acesso em: 16/12/2013.

KATZUNG. FARMACOLOGIA BÁSICA E CLÍNICA. 10a Edição. ArtMed, pág. 666, 2008

KIM, D. IL; IM, M. S.; CHOI, J. H.; et al. Therapeutic monitoring of vancomycin according to initial dosing regimen in pediatric patients. **Korean journal of pediatrics**, v. 53, n. 12, p. 1000-5, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3021725&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17/10/2013.

KIM, S.-W. Therapeutic Drug Monitoring (TDM) of Antimicrobial Agents. **Infection and Chemotherapy**, v. 40, n. 3, p. 133, 1 jun. 2008.

LAVOIE, A.; DELICOURT, A.; PENFORNIS, S.; et al. Implantation d'une nouvelle règle d'utilisation de la vancomycine: une étude pré-post. **Le Pharmacien Hospitalier et Clinicien**, v. 48, n. 3, p. 175-181, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211104213000131>>. Acesso em: 17/10/2013.

LIU, C.; BAYER, A.; COSGROVE, S. E.; et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52, n. 3, p. e18-55, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21208910>>. Acesso em: 23/1/2014.

LÓPEZ, K. J. V.; BERTOLUCI, D. F.; VICENTE, K. M.; DELL'AQUILLA, A M.; SANTOS, S. R. C. J. Simultaneous determination of cefepime, vancomycin and imipenem in human plasma of burn patients by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, v. 860, n. 2, p. 241-5, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023625>>. Acesso em: 16/12/2013.

LUKSA, J.; MARUSIC, A.; LUKŠA, J.; MARUŠIČ, A. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in human plasma. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 667, n. 2, p. 277-81, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843479500033F>>. Acesso em: 17/7/2014.

MACHADO, J. K.; FEFERBAUM, R.; DINIZ, E. M.; et al. Monitoring the treatment of sepsis with vancomycin in term newborn infants. *Revista do Hospital das Clínicas*, v. 56, n. 1, p. 17-24. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11378679>>. Acesso em: 22/3/2016.

MARTINDALE The Complete Drug Reference. *Clin Pharmacokinetics* 32a ed. 1999

MCKAMY, S.; HERNANDEZ, E.; JAHNG, M.; et al. Incidence and risk factors influencing the development of vancomycin nephrotoxicity in children. **The**

Journal of pediatrics, v. 158, n. 3, p. 422-6, 2011. Mosby, Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20888013>>. Acesso em: 17/10/2013.

MEYER, Veronika. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 4^a Ed. Bodmin-UK. John Wiley & Sons, Ltd. 2004.

MOISE-BRODER, P. A.; FORREST, A.; BIRMINGHAM, M. C.; SCHENTAG, J. J. Pharmacodynamics of vancomycin and other antimicrobials in patients with *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. **Clinical pharmacokinetics**, v. 43, n. 13, p. 925-42, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15509186>>. Acesso em: 3/3/2016.

MORRISON, A. P.; MELANSON, S. E. F.; CARTY, M. G.; et al. What proportion of vancomycin trough levels are drawn too early?: frequency and impact on clinical actions. **American journal of clinical pathology**, v. 137, n. 3, p. 472-8, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22338061>>. Acesso em: 31/1/2014.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Database; CID=14969. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14969>> Acesso em 16 ago. 2015).

ONG CT, NICOLAU DE. Rationale and utility of therapeutic drug monitoring for the optimization of antibiotic therapy. **Drug Monitoring and Clinical Chemistry. Handbook of Analytical Separations**, Vol. 5 Ed. Elsevier Chap. 8. 2004:pag 212-219.

LOUDIN, C.; VIALET, R.; BOULAMERY, A.; MARTIN, C.; SIMON, N. Vancomycin prescription in neonates and young infants: toward a simplified dosage. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 96, n. 5, p. F365-70, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21378399>>. Acesso em: 6/12/2013.

PACIFICI, G.; ALLEGAERT, K. Clinical pharmacokinetics of vancomycin in the neonate: a review. **Clinics**, v. 67, n. 7, p. 831–837, 2012. Faculdade de Medicina / USP. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-59322012000700021&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 20/12/2015.

PALAZZO, I. C. V.; ARAUJO, M. L. C.; DARINI, A. L. C. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 1, p. 179-85, jan. 2005.

POOLE, C. F. **The Essence of Chromatography**. 1^a Ed. Amsterdam, Holanda. Elsevier Science B. V., 2003

PRITCHARD, L.; BAKER, C.; LEGGETT, J.; et al. Increasing vancomycin serum trough concentrations and incidence of nephrotoxicity. **The American journal of medicine**, v. 123, n. 12, p. 1143-9, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21183005>>. Acesso em: 17/10/2013.

RIBANI, N.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C.; et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n5/a17v27n5.pdf>>. Acesso em 15/09/2015.

RQHR. RQHR Vancomycin Protocol. GUIDELINES FOR DRUG PRESCRIBING AND MONITORING. p.1-15, 2010. Saskatoon. Disponível em: <<http://www.cshp-sk.org/documents/Vancomycin Protocol RQHR.pdf>>. Acesso em 17/10/2013.

ROCHA, M. J.; ALMEIDA, A. M.; FALCÃO, A. C. Vancomycin kinetic profile in very low birth weight newborns. **Eur J Hosp Pharm Sci** v. 12, n. 2, p. 29-31, 2006.

RYBAK, M. J.; LOMAESTRO, B. M.; ROTSCHAFER, J. C.; et al. Vancomycin therapeutic guidelines: a summary of consensus recommendations from the infectious diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 49, n. 3, p. 325-7, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19569969>>. Acesso em: 17/10/2013.

SANTOS, C. R. DOS; FEFERBAUM, R.; PAULA, M. L. S. A. DE; et al. Micrométodo para quantificação da vancomicina em plasma através da cromatografia líquida de alta eficiência . Monitorização plasmática de vancomicina na sustentação farmacológica de neonatos com sepse. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** , v. 37, 2001. Acesso em 17/10/2013.

SATTUR, A. P.; LEE, J.-H.; SONG, K.-B.; et al. Analytical techniques for vancomycin—A review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 5, n. 3, p. 153-158, 2000. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02936586>>. .

SAUGEL, B.; NOWACK, M. C. M.; HAPFELMEIER, A.; et al. Continuous intravenous administration of vancomycin in medical intensive care unit patients. **Journal of critical care**, v. 28, n. 1, p. 9-13, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22459156>>. Acesso em: 17/10/2013.

SHEN, A; MORGAN, L; BARROSO, M. L; ZHANG, X; NGUYEN, T;. Method Development of LC-MS/MS Analysis of Aminoglycoside Drugs: Challenges and Solutions. Tandem Labs, 2008 Disponível em: <http://www.tandemlabs.com/documents/ASMS08-Angela-Web.pdf> Acesso em: 3/9/2015.

SHIBATA, N.; ISHIDA, M.; VENKATA RAMA PRASAD, Y.; et al. Highly sensitive quantification of vancomycin in plasma samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and oral bioavailability in rats. **Journal of Chromatography B**, v. 789, n. 2, p. 211-218, 2003. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023203000680>>. Acesso em: 17/7/2014.

SILVA, J.; BATTIS, D. H.; FEKETY, R.; et al. Treatment of Clostridium difficile colitis and diarrhea with vancomycin. **The American journal of medicine**, v. 71, n. 5, p. 815-22, 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7304654>>. Acesso em: 12/2/2014.

TAN, W.-H.; BROWN, N.; KELSALL, A W.; MCCLURE, R. J. Dose regimen for vancomycin not needing serum peak levels? **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 87, n. 3, p. F214-6, 2002. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1721472&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

TOBIN, C. M. Vancomycin therapeutic drug monitoring: is there a consensus view? The results of a UK National External Quality Assessment Scheme (UK NEQAS) for Antibiotic Assays questionnaire. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 713-718, 2002. Disponível em: <<http://www.jac.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dkf212>>. Acesso em: 21/10/2013.

TRUJILLO, T. N. et al. Vancomycin assay performance in patients with acute renal failure. **Intensive care medicine**, v. 25, n. 11, p. 1291-6, nov. 1999.

USP. **The United States Pharmacopoeia**. 32. ed: Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2009.

U.S. Department of Health and Human Services. **Draft guidance for industry: bioanalytical method validation (Revised)**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>> Acesso em: 21/10/2013

VANDENDRIESSCHE, A.; ALLEGAERT, K.; COSSEY, V.; et al. Prospective validation of neonatal vancomycin dosing regimens is urgently needed. **Current therapeutic research, clinical and experimental**, v. 76, p. 51–7, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4099512&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20/12/2015.

VASCONCELOS, J. F. et al. **Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation**. Disponível em: <[http://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/1895/1/Effects of umbelliferone in a murine model.pdf](http://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/1895/1/Effects%20of%20umbelliferone%20in%20a%20murine%20model.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2015.

VENUGOPAL, A. A.; JOHNSON, S. Current state of Clostridium difficile treatment options. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 55 Suppl 2, p. S71-6, 2012. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3388023&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25/1/2014.

VERA LÓPEZ, K. J.; BERTOLUCI, D. F.; VICENTE, K. M.; DELL'AQUILLA, A. M.; SANTOS, S. R. C. J. Simultaneous determination of cefepime, vancomycin and imipenem in human plasma of burn patients by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 860, n. 2, p. 241-5, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023625>>. Acesso em: 16/12/2013.

YE, G.; CAI, X.; WANG, B.; et al. Simultaneous determination of vancomycin and ceftazidime in cerebrospinal fluid in craniotomy patients by high-performance liquid chromatography. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 48, n. 3, p. 860-5, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18657374>>. Acesso em: 16/12/2013.

YOSHIDA, M.; YASUDA, N.; NISHIKATA, M.; et al. New recommendations for vancomycin dosage for patients with MRSA pneumonia with various degrees of renal function impairment. **Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 11, n. 4, p. 182-8, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16133709>>. Acesso em: 6/10/2015.

YOUNG, T. E. Therapeutic drug monitoring--the appropriate use of drug level measurement in the care of the neonate. **Clinics in perinatology**, v. 39, n. 1, p. 25-31, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22341534>>. Acesso em: 17/10/2013.

ANEXOS**ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)*****TCLE PARA REPRESENTAÇÃO LEGAL***

*******(este modelo é para menores de 16 anos ou para pessoas absolutamente incapazes, cujo representante legal o representa e assina por ele)*****

O recém-nascido (***nome do participante da pesquisa, nacionalidade, idade***), neste ato representado por mim, (***nome do representante legal, nacionalidade, idade, estado civil, profissão, endereço, grau de parentesco com o participante da pesquisa ou qualificação como tutor ou curador***), está sendo convidado a participar de um estudo denominado "***Dosagem de níveis séricos de vancomicina em unidade de terapia intensiva neonatal.***", cujos objetivos e justificativas são: ***Verificar se a concentração do antibiótico vancomicina no sangue do paciente está de acordo com os valores recomendados para o tratamento. Fornecer esta informação a equipe médica para que, caso necessário, seja feita a adequação da dose do medicamento.***

A vancomicina é o antibiótico de escolha para determinados tipos de infecção. No entanto, este medicamento só será eficiente caso a dose esteja adequada. Desta forma, este estudo busca uma forma de melhorar a segurança e a eficácia do tratamento medindo a quantidade do medicamento no sangue.

A sua participação no referido estudo será no sentido de ***autorizar que sejam colhidas amostras de 0,5 a 1mL de sangue do participante. O número de coletas a ser realizado dependerá da decisão dos médicos responsáveis pelo tratamento do participante, as coletas para este exame, deverão ser realizadas com intervalo mínimo de 24 horas. Com seu consentimento também serão avaliadas informações clínicas em prontuário, tais como peso, idade, outros medicamentos administrados, tempo de internamento e resultados de exames.***

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, é possível esperar alguns benefícios para o meu representado, tais como: ajustar adequadamente as doses e melhorar o controle da ação do medicamento evitando situações onde a dose esteja muito alta ou muito baixa favorecendo, desta forma, um tratamento com melhor segurança e efetividade.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. ***Serão retirados 0,5 a 1mL de sangue do paciente a cada coleta. Isto pode gerar desconforto devido ao manuseio do paciente.***

Estou ciente de que a sua privacidade será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, o (a) identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que pode haver recusa à participação no estudo, bem como pode ser retirado o consentimento a qualquer momento, sem precisar haver justificativa, e de que, ao sair da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo à assistência que vem recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são ***Rogério Rodrigues Vilas Boas, Dra. Silmara Aparecida Possas, Dr. Fábio de Araujo Motta e Dr. Marco André Cardoso, vinculados à Associação Hospitalar de Proteção à Infância Dr. Raul Carneiro*** e com eles poderei manter contato pelos telefones ***041 84974437, 041 33101356 e 041 33101035.***

É assegurada a assistência do meu representado durante toda a pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da participação de ***(nome do participante da pesquisa).***

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do estudo, autorizo a participação de ***(nome do participante da pesquisa)*** na referida pesquisa, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação.

No entanto, caso haja qualquer despesa decorrente da sua participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma seguinte: por meio de depósito em conta do responsável legal pelo paciente. De igual maneira, caso ocorra qualquer dano decorrente da participação no estudo, este será reparado, conforme determina a lei.

Este projeto de pesquisa e este termo de consentimento foi aprovado pelo (nome do comitê de ética em pesquisas), da instituição (nome da instituição), em Dia de Mês de Ano.

Curitiba, ____ de _____ de 2015

(Assinatura e RG do representante legal do sujeito da pesquisa - juntar documento que comprove parentesco/tutela/curatela)

Nome(s) e assinatura(s) do(s) pesquisador(es) responsável(responsáveis)

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: ROGÉRIO RODRIGUES VILAS BOAS

ENDEREÇO: AVENIDA IGUAÇU 333, REBOUÇAS

CURITIBA- PR - CEP: 80230-020

FONE: (41) 8497-4437 / E-MAIL: ROGERIO.RODRIGUES@HPP.ORG.BR

ANEXO B - ARTIGO ORIGINAL RELACIONADO A DISSERTAÇÃO

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A QUICK, SIMPLE AND LOW COST HPLC-DAD METHOD FOR QUANTIFICATION OF VANCOMYCIN IN HUMAN SERUM

*Rogério Rodrigues Vilas Boas¹, Marco André Cardoso^{2,3}, Roberto Pontarolo²,
Marinei Campos Ricieri⁴, Fábio de Araújo Motta⁴, Camila Bach de Assis³,
Bertoldo Schneider Jr¹,*

1. *Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Paraná, Brasil.*
2. *Universidade Federal do Paraná (UFPR), Paraná, Brasil.*
3. *Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (IPPPP), Paraná, Brasil.*
4. *Hospital Pequeno Príncipe (HPP), Paraná Brasil.*

Corresponding author

<Rogério Rodrigues Vilas Boas, Avenida Iguazu 333, Curitiba, Paraná, Brasil.

F: (41) 3310 1500, rogeriorvb@gmail.com>

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO SIMPLIFICADO E DE BAIXO CUSTO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE VANCOMICINA EM SORO HUMANO POR CLAE-DAD

O monitoramento terapêutico (MT) da concentração sérica de vancomicina é uma forma de melhorar a segurança e a eficiência do seu uso. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é considerada padrão ouro para a quantificação desta droga. Muitos métodos que empregam esta técnica exigem que sejam realizados vários procedimentos de purificação da amostra, reduzindo sua aplicabilidade clínica. Este artigo desenvolve e valida um método simplificado para quantificação sérica da vancomicina através de CLAE. Aplicou-se a precipitação de proteínas com ácido trifluoroacético (ATF) e injeção direta do sobrenadante. A fase móvel consistiu de ATF 0,014% (pH 2,8) e acetonitrila (92:8, v/v), sob fluxo de 2 mL/min a 40°C com leitura em 230,9 nm. A validação foi conduzida de acordo com a legislação nacional vigente e as normas do FDA. O analito e o padrão interno (7-hidroxycumarina) foram eluídos próximos a 5,6 e 10,8 min, respectivamente. A linearidade do método foi determinada entre 2 e 70 mg/L com correlação linear superior a 0,999. O método apresentou vantagens como baixo volume de amostra exigido, processo de extração simplificado e resultados satisfatórios em relação aos critérios de validação. O método foi aplicado com sucesso na determinação sérica de vancomicina em pacientes tratados.

PALAVRAS CHAVE

Vancomicina, Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE), Monitorização Terapêutica de Droga, Validação, Aplicação Clínica.

Therapeutic drug monitoring (TDM) of the vancomycin can improve the safety and efficiency of the treatment with this antibiotic. HPLC is considered the gold standard for quantification of vancomycin. However, most HPLC methods requires multiple procedures for purification and analysis of the sample, which reduces their applicability for clinic use. This article develops and validates a low cost, simplified method, with smaller sample volume requirement for determination of serum concentration of vancomycin by HPLC-DAD. Vancomycin was extracted by protein precipitation with trifluoroacetic acid (TFA), followed by direct injection of supernatant into chromatographic system. Mobile phase consisted of TFA 0.014% (pH 2.8) and acetonitrile (92:8, v/v) at 2 mL/min flow rate and 40°C. Response were monitored at 230.9 nm. Validation was conducted in accordance with Brazilian and FDA regulations. Vancomycin and internal standard (7-hydroxycoumarin) were eluted at approximately 5.6 min. and 10.8 min, respectively. Linearity was assessed between 2 and 70 mg/L with linear correlation greater than 0.999. Advantages of new method were low sample volume, simpler pretreatment, and adequate linearity for measuring trough levels in human serum, besides satisfactory results regarding all validation requirements. Method was applied for determination of serum levels from treated patients, showing suitability for vancomycin TDM.

KEYWORDS

<Vancomycin, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Method Validation, Therapeutic Drug Monitoring, Clinical Monitoring>

INTRODUCTION

Vancomycin is a glycopeptide antibiotic that acts inhibiting the cell wall synthesis of gram-positive bacteria, limiting its replication (Ong; Nicolau, 2004). Nowadays, is the drug of choice for the treatment of Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Jacqz-Aingran *et al.*, 2013)

Vancomycin shows a narrow therapeutic range (Rocha; Almeida; Falcão 2006). Insufficient dosing is related to treatment failure and development of resistant strains, and higher doses can lead to toxic effects like ototoxicity and nephrotoxicity (Hoog; Mouton; Anker, 2004).

The incidence of MRSA strains resistant to vancomycin, and with reduced susceptibility towards the drug, caused an increase in the recommended dosage which can result in toxicity risk (McKamy *et al.*, 2011).

Effectiveness of vancomycin depends on its blood concentration being above the minimum inhibitory concentration (MIC) of the microorganism during the entire treatment (Ong; Nicolau, 2004). Unfortunately, the drug distribution is different from patient to patient, and factors like renal clearance, body weight, fluids distribution, burned patients, and gestational age in newborns can significantly change de pharmacokinetic of the drug (Hoog; Mouton; Anker, 2004; Feferbaum; Machado 2001; Gomez *et al.*, 2013). Critically ill newborns have a high susceptibly to gram positive infections associated with catheters, the most common agents being coagulase negative *Staphylococcus* and *Staphylococcus aureus* (Sinkeler *et al.*, 2014). In the newborn population, pharmacokinetic studies has shown further variability not fully explained by factors such as weight, age and creatinine level (Pacifici, Allegaert, 2012). Beacuse of these variabilities, therapeutic drug monitoring (TDM) of serum concentration is recommended to ensure safety and effectiveness of vancomycin treatment in newborns (Kim *et al.*, 2010).

Vancomycin serum level can be measured by diverse methods such as microbiologic assay, polarized immunofluorescence, radioimmunoassay, immunoenzimatic assay and high performance liquid chromatography (HPLC) (Santos *et al.*, 2001).

HPLC is recognized as a reliable and highly reproducible method (JHEL *et al.*, 1985, DIANA *et al.*, 2003), and has been regarded as gold standard for vancomycin quantification (Trujillo, *et al.*, 1999). However, most current HPLC methods require multiple procedures for sample preparation such as extraction, evaporation, and filtration which can impact its clinical application and increase costs (Santos *et al.*, 2001; Hagigara; Sutherland; Nicolau 2013).

The objective of this study is to describe the development and validation a feasible, simplified, less time consuming, and low sample volume requirement HPLC-DAD method for the quantification of serum vancomycin, suitable for application in pediatric and neonatal TDM.

METHODS

Chemicals, reagents and solutions

Vancomycin Standard (>95%), 7-oh-coumarine (>95%), and Sodium acetate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile HPLC grade (Tedia Fairfield, EUA), Trifluoroacetic acid HPLC grade (TediaBrasil RJ, Brazil), Trichloroacetic acid 98% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, PR, Brazil), Chloridric Acid (36-38% v/v) (Mallinckrodt Baker, Edo. de Mexico, México), Perchloric Acid (VETEC, RJ Brazil), , and Monobasic sodium fosfate (Casa da Química, PR, Brazil). Drug free serum samples were obtained from Hemocenter of the State of Paraná, Brazil and Clinical Laboratory of Federal University of Paraná.

Chromatography conditions

The assay was carried on an Agilent 1100 HPLC system, that consisted of a G1311A binary pump, G1379A degasser, G1329A sample manager,

G1316A column oven, diode array detector (PDA) G1315B and data acquisition system ChemStation for LC 3D systems (Agilent Technologies, EUA). The chromatographic separation was performed on a reverse-phase chromatography Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution column (150 × 4.6 mm I.D., 3.5 µm) maintained at 40 °C. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile: 0.014% TFA solution in water (92:08, v/v) at a flow rate of 2.0 mL/min. Response were monitored at 230.0 nm.

Sample Extraction

An aliquot of 100 µL of serum from patients treated with vancomycin was placed into a 1.5 mL polypropylene reaction tube, combined with 12.5 µL of IS and vortexed (1 min). The sample extraction was followed by adding 25 µL of 85% TFA to precipitate proteins. After vortexing (1 min) and centrifugation (13000 rpm for 30 min) 100 µL of the supernatant was transferred to clear vial and directly analyzed.

Validation procedure

The method was validated for selectivity, carryover, matrix effect, linearity, sensitivity, specificity, precision, accuracy, and stability according to Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) and US Food and Drug Administration (FDA) bioanalytical method validation guidelines (BRASIL, 2012; U.S., 2001).

Selectivity and carryover

The selectivity of the method was evaluated by comparing chromatograms of four batches of distinct blank human serum (including lipemic and hemolyzed), spiked at LLOQ concentration and not spiked, to ensure that there were no significant interfering peaks in the analyte and IS regions. The samples were prepared as described above.

Carryover was investigated by injecting two blank serum samples directly after a ULOQ sample in an analytical run. The carryover test was met if no interfering peaks appeared with areas greater than 20% of the peak areas at the LLOQ level of each analyte and 5% of the IS peak area.

Recovery and matrix effect

Recovery and matrix effect were evaluated at concentrations of 5, 30 and 60 mg/L. The recovery was determined by comparing the peak areas obtained from blank serum samples spiked with vancomycin and IS before precipitation (A) with those obtained from standard solutions at the same concentration (B). The percentage ratio of B/A was defined as recovery. Matrix effect was analyzed by extracting blank human serum from five different sources (including lipemic and hemolyzed serums) spiked with vancomycin and IS post-precipitation (B). The matrix factor was determined by comparing these HPLC responses with responses obtained using pure solutions prepared at the same concentrations of standard solutions in the mobile phase without any matrix. The acceptance criterion was a relative error (RE) of 15% for all samples and a relative standard deviation (RSD) of 15% for all IS-normalized matrix factor samples.

Linearity and sensitivity

To obtain the calibration curve, determined in triplicate, aliquots of 100 μL of blank human serum were enriched with 12.5 μL of an appropriate concentration of the vancomycin working standard solution to obtain concentrations of 2, 5, 15, 30, 45, 60, and 70 mg/L. The quality control (QC) samples were prepared in the concentration range of 5, 30, and 60 mg/mL. 12.5 μL of the IS (120 mg/L) was added to each solution, which was then subjected to the process of sample preparation and chromatographic analysis, as described above.

Quantitation of vancomycin was performed using the IS method dividing the peak area of vancomycin by the area of the IS (vancomycin peak areas/IS peak areas) and plotting as a function of the vancomycin concentration. The slope, intercept, and regression coefficient (r) were calculated as regression parameters by weighted ($1/x$) linear regression. The acceptance criteria for calibration curves included a linear correlation coefficient greater than or equal to 0.99, a deviation less than or equal to 20% compared to the nominal concentration for the lower limit of quantification, and a standard deviation less than or equal to 15% over nominal concentration for the other concentrations of the calibration curves.

LLOQ was calculated as the lowest concentration peak at a s/n ratio of at least 10:1 and an RSD of 20%. The LLOD was calculated as the lowest concentration peak at a s/n ratio of at least 3:1

Accuracy, precision, and dilutional integrity

Precision and accuracy were determined within-day and between-day by a set of five replicates of each QC level in three days. Precision were determined by the percentual coefficient of variation (CV%) and accuracy by the relative standard error (RSE).

The studies of dilutional integrity were performed on serum samples containing 83 mg/L of vancomycin that were diluted 2-fold dilutions with equal

part of drug free serum and sample and evaluated for precision and accuracy as described above.

Stability

The samples were evaluated under normal working conditions: within a period of 20 days stored at -20°C , after three freeze-thaw cycles (stored at -20°C between cycles), within a period of 48 h at 4°C , and within a period of 8 h storage in the sample manager (25°C) after and before the extraction. Samples were considered stable if assay values were within acceptable limits of accuracy, precision, and paired t-test ($p > 0.05$). Stock standard solutions were stored at -20°C and were also evaluated within a period of 20 days. The stock solutions were considered stable if peak area values were $<15\%$ RSD and RE compared with those of freshly prepared solutions

Therapeutic drug monitoring and experimental protocol

The present study was approved by the local research ethics commission under the Certificate of Presentation for Ethical Consideration number: 27459814.4.0000.5580 and was conducted from October 2015 to December 2015. Blood samples were collected under informed consent by all legally designated patient representatives.

The method was tested in 15 real samples from 9 newborn patients up to 93 days old from the Neonatal Intensive Care Unit of Pequeno Príncipe Hospital in use of vancomycin for gram positive infection treatment. Samples were taken after at least three doses of vancomycin had been administrated and in less than 30 minutes before the next dose for trough levels.

The samples were stored frozen at -20°C , thawed unassisted at room temperature prior to analysis, and were prepared with the procedure described

in sample preparation. Chromatographic results were compared to a recently prepared calibration curve. Samples were tested in triplicate, results were evaluated for selectivity, chromatographic quality and measured value coherence.

RESULT AND DISCUSSION

Method development

The purpose of the present study was to develop a simple, rapid and reliable bioanalytical method for the detection of vancomycin in human serum with simple sample preparation and a simple mobile phase.

To develop a new sensitive and selective method for the quantification of vancomycin various factors and parameters of HPLC were optimized based in previously reported methods for the determination of this compound in serum. (Santos *et al.*, 2001, López *et al.*, 2007, Shibata *et al.*, 2003, Valle *et al.*, 2008). The analyte peaks were confirmed by matching their retention times and UV spectra with solutions of standards.

The first step for optimization of chromatographic conditions was the choice of column to obtain the best *s/n* ratio and peak shape, short run time and adequate resolution. Different analytical columns and mobile phase compositions were evaluated to optimize specificity and selectivity. Several columns were evaluated for their optimum chromatography in terms of retention and sensitivity. The best results for vancomycin were obtained on the Zorbax Eclipse C18 3,5 μm , 4,6x150mm Agilent Technologies (Santa Clara, EUA), which was then used in the final method.

In terms of the analysis condition, various mobile phases, in different proportions, buffered and non-buffered at various pH, were attempted to provide the best peak shape and less retention time. This revealed that

acetonitrile rather than methanol decreased the analysis time, avoid the matrix effects, resulted in the best resolution, and highest signal-to-noise ratio.

Increasing the acetonitrile concentration decreased the retention time of both vancomycin and IS. Therefore, the proportion and composition of the mobile phase content was defined as TFA 0.014% (pH 2.8)/acetonitrile (92:8 v/v) to decrease the retention time of both vancomycin and IS.

The effect of pH of the mobile phase on the retention times for the tested compounds was investigated using mobile phases of TFA with pH ranging from 2.2 to 3.5. The TFA was found to be necessary in order to lower the pH to protonate the vancomycin and thus deliver good peak shape. It was found that, increasing the pH increase the retention time of both vancomycin and IS. As our research has suggested, low pH was considered an important factor for increasing vancomycin recovery and solubility (Shen *et al.*, 2008, U.S., 2008 Shibata *et al.*, 2003). TFA was chosen because it was capable of achieving the desired pH range in solution (from 2.0-3.5) and was already part of the extraction procedure, also, several other mobile phase compositions were tested previously (Monobasic Sodium Phosphate, Sodium Acetate and Acetonitrile) and showed poor results when compared with TFA mobile phase.

LC conditions such as injection volume, and flow rate, which could significantly influence the separation and retention times, were also optimized through several trials. After all improvements, each chromatographic run was completed within 11 min, thereby allowing high sample throughput. The final method was found to be sensitive and accurate compared with already known HPLC-UV methods.

Extraction procedure optimization

Serum, a complex biological matrix, could prevent the drugs from detection. Therefore, removal of proteins and potential endogenous interferences is necessary.

Solid-phase extraction, and direct protein precipitation (PP) were carried out to investigate the optimal method for sample extraction. A new extraction procedure for vancomycin was fully assessed and validated in our method involving simple extraction procedure with no subsequently evaporation step.

A PP method with TFA was developed to cleans up the samples more efficaciously, which resulted in great reduction of lower background noise. The results revealed that suitable extract efficiency with the highest recovery can be obtained by adding 25 uL of 85% TFA to 100 uL of serum. This is in accordance with the initial aims, once the method was planned to demand a lower sample volume when compared to other techniques (López *et al.*, 2007, Luksa *et al.*, 1995), an important factor for newborn care.

Sample preparation was simplified, involving just protein precipitation and direct supernatant injection, without further procedures like filtration or evaporation, as proposed by other authors (Santos *et al.*, 2001, Ahsman *et al.*, 2009). Moreover, extraction procedure needs just one reagent (TFA), the same reagent applied to the mobile phase constitution along with ACN.

Finally, this procedure was selected because of its simplicity, good peak shapes, high extraction efficiency and capacity, and acceptable recovery of the analytes comparable with other methods (Santos *et al.*, 2001, Ahsman *et al.*, 2009). Additionally, the developed extraction procedure has the added benefit of reduce the volume of solvent required minimizing waste and saving money.

Assay validation

Selectivity and Carryover

From the chromatogram of blank serum, selectivity was verified and no interference peak was observed. The representative chromatogram of blank

extracted serum and vancomycin (LLOQ) and IS spiked serum is shown in the Figure 2.

No significant interfering peaks from endogenous substances in serum were observed at the retention times of analytes showing that the developed method is selective and free from other possible interferences. The retention times of vancomycin and IS were 5.6, and 10.8 min, respectively, with good peak shapes and excellent resolution from the endogenous substances or metabolites. Furthermore, good selectivity in hemolysate and lipemic matrix allows less sample rejection.

Carryover for the established method was assessed qualitatively by monitoring blank samples after injection of the high standard and was found to be acceptable (<20% of the peak area of the LLOQs) in the linear range of the assays.

Recovery and matrix effect

The relative recovery of vancomycin was demonstrated to be greater than 70%, which revealed that the extraction procedure was reproducible, consistent, and acceptable.

The mean matrix effect for vancomycin was 1.02 with RSD 12.9%, indicating that matrix effect from endogenous substances would not interfere with the quantitation of vancomycin under the evaluated experimental conditions.

Linearity and sensitivity

A linear relationship of calibration curves was found over the concentration range of 2 - 70 mg/L with correlation coefficient $r^2 \geq 0.9998$, as

shown in Figure 1. The mean regression equation was: $y = 0,0831x + 0,0104$, where Y represents the peak area ratio and X represents the serum concentration of vancomycin. Variations in peak area for IS were relatively small within-day and between-day.

These values are adequate for therapeutic vancomycin monitoring trough concentrations in human serum. Values below 5 mg/L are considered sub-therapeutic and values above 20 mg/L are considered excessive (Rybak et al., 2009, Kim 2010). Other methods had achieved greater range of linearity as 0.4-100 mg/L (Lopez *et al.*, 2007) applying larger sample volume and additional sample preparation procedures.

The calibration curves showed a strong correlation between the peak area ratio and concentration of the analyte and acceptable results of the back-calculated concentrations of vancomycin.

The DL and the LLOQ was determined as 1 mg/L and 2 mg/L in serum, respectively, with demonstrates the high sensitivity of the developed method. Other methods using mass spectrometry detection can achieve LLOQ as low as 0.01 mg/L (Shibata, *et al.*; 2003), but such high sensitivity is not needed for TDM in serum.

Accuracy, precision, and dilutional integrity

Accuracy and precision results are summarized in table 1. Acceptable precision and accuracy was found, CV% was inferior to 9.23% between-day and 7.81% within-day in all samples, maximum RSE was 4.27% between-day and 9.42% within-day. Taken together, both intra-day and inter-day accuracy and precision were within 15%, as stipulated by the ANVISA and FDA guidelines. (BRAZIL , 2012; U.S., 2001).

These results shown that the present HPLC method was accurate, reliable, and yielded satisfactory reproducibility.

As per FDA and ANVISA recommendations, studies were performed to ensure the dilutional integrity of specimens that may contain vancomycin levels above the ULOQ (70 mg/L). Precision and accuracy of diluted samples ranged from 95.5-98.6 % and 92.8-96.2%, respectively. These data are within acceptable limits and indicate that samples above the highest calibrator can be diluted for posterior analysis.

Stability

The results obtained during short and long term stability for the analyte of interest are indicated in Table 2. The results of stability of vancomycin in serum was investigated at the concentrations of 5 and 60 mg/L and revealed that the vancomycin in serum was stable for at least two days at 4 °C, 8 and 5 h at room temperature before and after the extraction of the analyte of interest, respectively, 20 days at -20 °C, and at three freeze-thaw cycles with an average mean percentage change of 2.52–6.48%, respectively.

Stock solutions of vancomycin was shown to be stable for at least 2 weeks under room temperature and at least 63 days under refrigeration (AHFS, 2009). In our study stock solutions of vancomycin and IS were kept under -20°C and was considered stable for a period of at least 20 days.

The results established that the vancomycin dissolved in serum is stable under all the applied storage conditions, freeze-thaw cycles, and throughout the entire analytical process demonstrating that the developed method can be implemented to support several clinical samples with a high-throughput.

Application to Human Serum Samples

The validated method was successfully applied to quantify the concentration of vancomycin in 16 human serum samples obtained from 10

newborn patients with age varying from 10 to 92 days of living, undergoing vancomycin treatment in neonatal ICU.

Clinical samples had shown similar results to QC samples (figure 3), and no interfering peaks were observed near the retention times of vancomycin and IS. Measured levels from 21.0 to 5.7 mg/L (table 3), results of each sample replicate are expressed in figure 4.

This results demonstrate that the developed method can be applied in real patient samples as a viable choice for therapeutic drug monitoring of vancomycin, especially for newborn population, and can be implemented in other laboratories performing serum sample analysis using similar equipment.

CONCLUSION

The developed and validated bioanalytical method for the analysis of vancomycin in human serum proved to be very effective both for the detection and quantification of the drug. The extraction procedure and HPLC-UV conditions were optimized in order to improve the sensitivity and robustness of the method, allowing the detection of low dosages in pediatric patients.

The main advantages of the new method were low sample volume demand, simpler sample pretreatment (one-step extraction), adequate linearity for measuring vancomycin trough therapeutic levels in human serum and satisfactory results regarding stability, selectivity, accuracy and precision, making it suitable for the proposed application considering the consulted regulations.

The method was also successfully applied for determination of the vancomycin serum levels obtained from treated patients, showing that it is suitable for therapeutic drug monitoring of this antibiotic.

Studies with larger sample size, clinical correlation and comparison of the results with other methods are possible next steps for this work.

TABLES

TABLE 1 - Precision and accuracy results for vancomycin in serum samples.

Nominal Concentration (mg/L)	Accuracy (RSE)		Precision (CV%)	
	Between-day	Within-day	Between-day	Within-day
2	-4.27	0.27	9.23	7.81
5	3.32	9.42	4.40	4.88
30	4.04	1.33	4.35	0.73
60	-1.29	-2.44	2.94	1.02
83	1.42	1.46	7.16	3.78

CV = Coefficient of variation $[(SD/media) \times 100]$;

RSE = $[(C \text{ average experimental} - C \text{ added}) / C \text{ added}] \times 100$

TABLE 2 - Stability results for vancomycin in serum samples.

Stability		Control	Control
		Concentration 5 mg/L	Concentration 60 mg/L
Solution at 4°C (48h)	Measured concentration		
	(mg/L ± SD)	5.1 ± 0,1	58.5 ± 1,6
	CV (%)	2.88	2.83
	RSE (%)	+1.07	-6,17
Short Term sample at room temperature (8h)	Measured concentration		
	(mg/L ± SD)	4.7 ± 0,6	59.8 ± 6,4
	CV (%)	12.41	10.69
	RSE (%)	-6.49	-0.32
Post extraction sample at room temperature (5h)	Measured concentration		
	(mg/L ± SD)	4.7 ± 0,5	51.6 ± 1,0
	CV (%)	9.95	1,97
	RSE (%)	-6.82	-13.99
After three 12 hours freezing/thawing cycles	Measured concentration		
	(mg/L ± SD)	5.3 ± 0,1	58.5 ± 1.4
	CV (%)	+2.37	2.34
	RSE (%)	6.38	-2.58
Long Term Samples at -20°C (20 days)	Measured concentration		
	(mg/L ± SD)	5.26 ± 0,4	56.1 ± 0,8
	CV (%)	7.84	1.51
	RSE (%)	+5.29	-6.48

CV = Coefficient of variation [(SD/media) x 100];

RSE = Relative standard error

SD = Standard Deviation

TABLE 3 - Summary of vancomycin serum concentrations in treated patients.

Sample ID	Daily Dose (mg/kg/day)	Creatinine Clearance (mg/dL)	Trough Level (mg/L)	Coefficient of Variation (%)
1	30	148.5	7.3	3.8
2	40	74.3	11.9	7.5
3	45	96.8	21.7	6.8
4	30	96.8	5.9	3.7
5	30	79.2	13.8	7
6	30	71	7.9	4.2
7	45	71	8.4	3.9
8	30	72.6	5.7	4.8
9	60	155.1	17.3	4.2
10	30	72.6	6	3.2
11	45	72.6	11.3	1.5
12	30	57.8	6.1	0.6
13	45	57.8	13.7	3.7
14	45	78	8.2	2.2
15	30	73.5	11.5	3.5
16	45	58.5	9.2	2.3

Figure 1 - Calibration curve of vancomycin in human serum in the range of 2 - 70 mg/L.

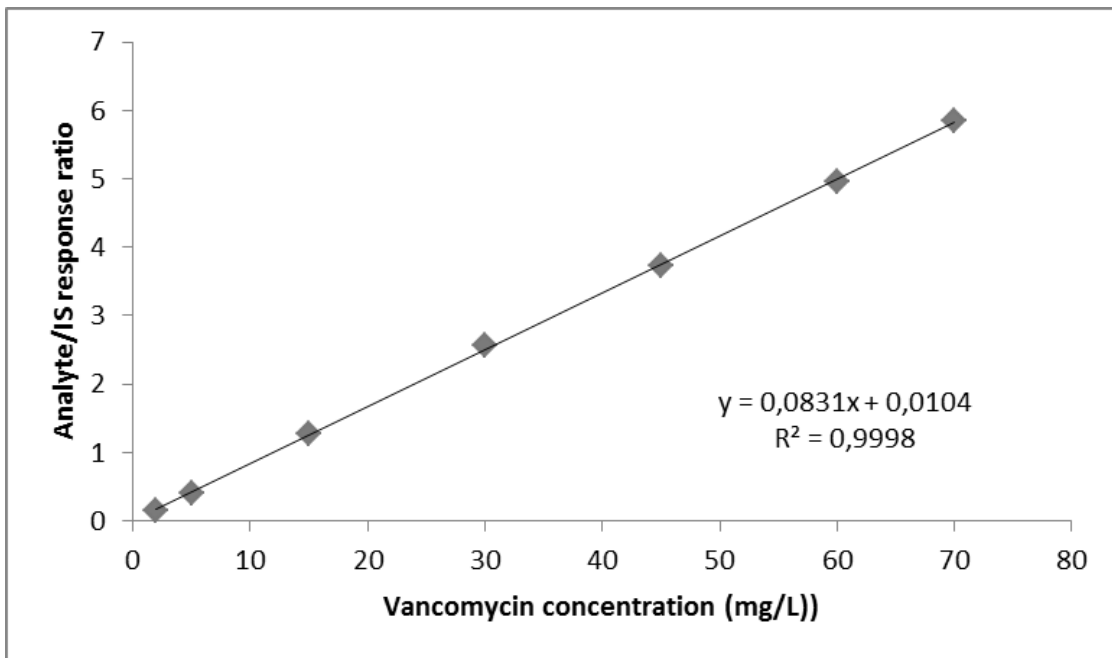


Figure 2 - Blank human serum chromatogram (A); serum sample spiked with LLOQ (2 mg/L) of vancomycin and IS (B).

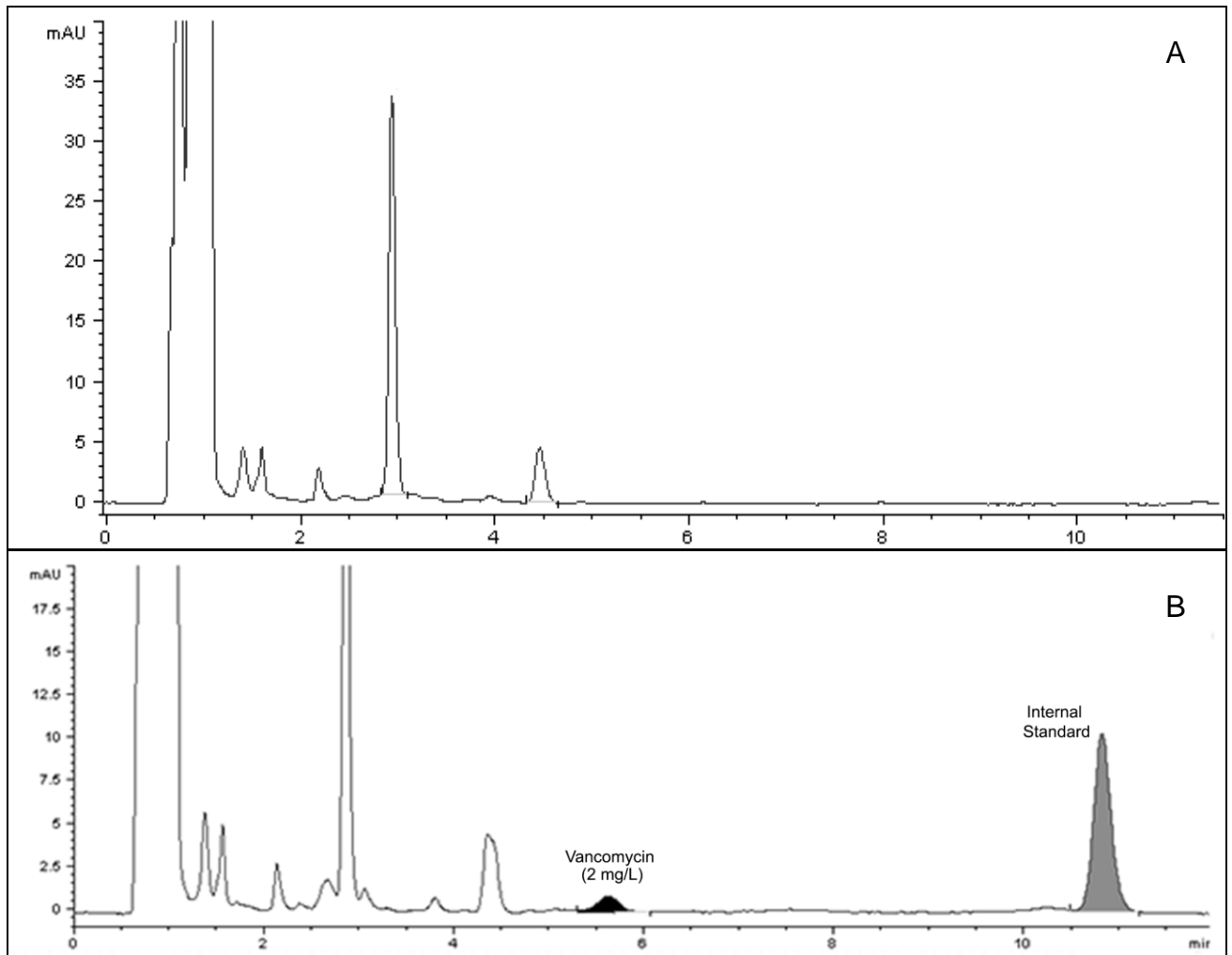


Figure 3 - Chromatogram of serum trough from patient undergoing vancomycin therapy 45 mg/kg/day spiked with IS (7-hydroxycoumarin).

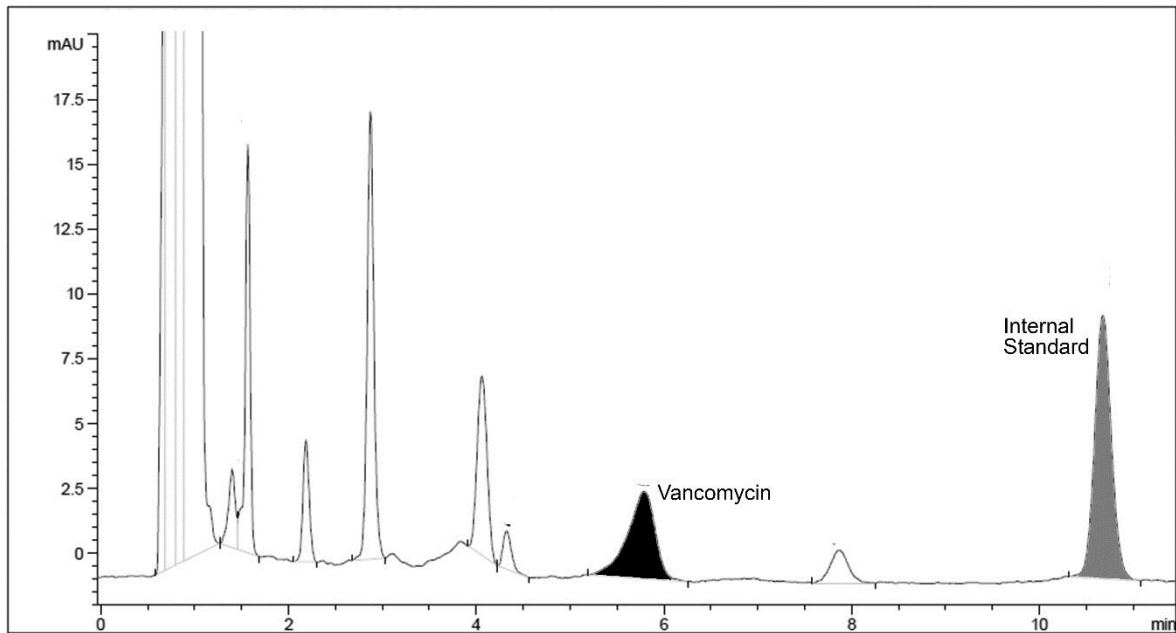
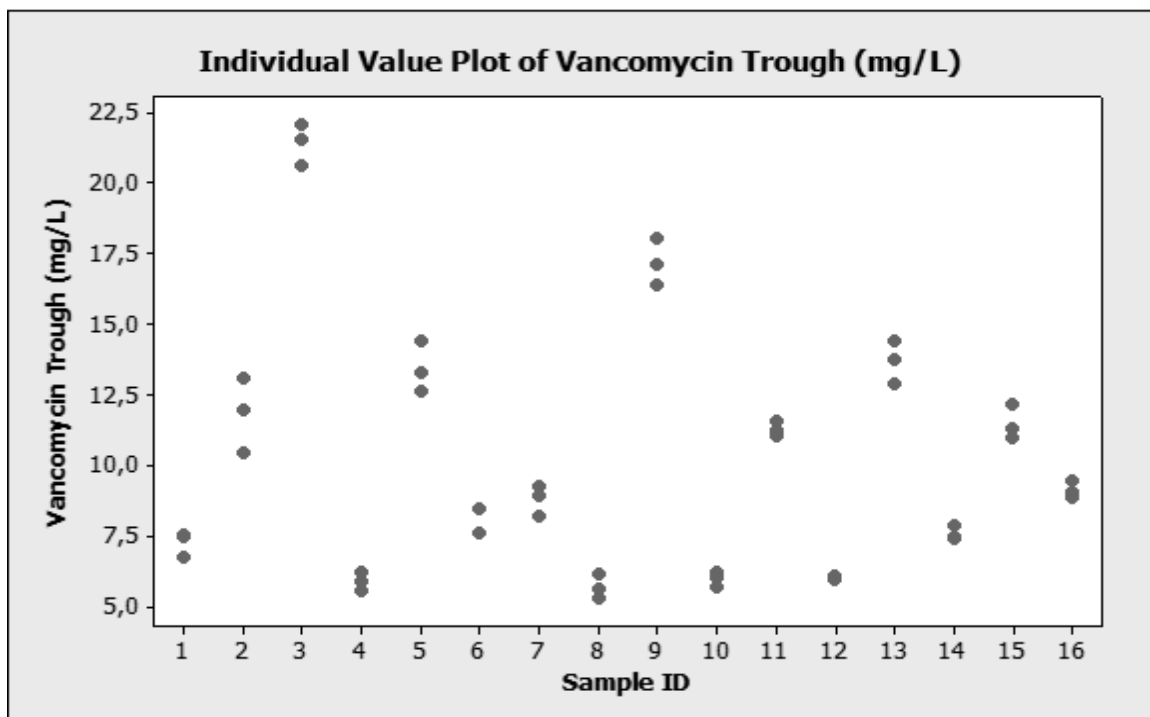


Figure 4 - Individual value plot of evaluated clinical samples using the developed and validated method.



Acknowledgements

This work has been supported by the Center for Studies in Biopharmacy from Federal University of Paraná (CEB-UFPR), from the Hospital Associação de Infância Protection Dr. Raul Carneiro and the Biomedical Engineering Post Graduation Program (PPGEB) from Federal Technological University of Paraná (UTFPR).

Conflict of Interest:

All the authors declare no conflict of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES

- AHSMAN MJ, WILDSCHUT ED, TIBBOEL D, MATHOT R A. Microanalysis of beta-lactam antibiotics and vancomycin in serum for pharmacokinetic studies in neonates. **Antimicrob. Agents Chemother.** Jan. 2009; 53(1):75-80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2612158&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- AMERICAN SOCIETY OF HEALTH SYSTEM PHARMACISTS; AHFS Drug Information 2009. Bethesda, MD. (2009), p. 485
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Bioanalytical Method Validation. Resolution RDC n° 27, 17 of may 2012.
- DIANA J, VISKY D, ROETS E, HOOGMARTENS J. Development and validation of an improved method for the analysis of vancomycin by liquid chromatography selectivity of reversed-phase columns towards vancomycin components. *J. Chromatogr. A.* May. 2003;996(1-2):115-31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12830913>
- FEFERBAUM R, MACHADO J. Vancomycin monitoring in term newborns: comparison of peak and trough serum concentrations determined by high performance liquid chromatography and Fluorescence Polarization Immunoassay. *Rev. Hosp. Clin.* vol.56 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2001. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0041-87812001000500004&script=sci_arttext
- GOMEZ DS, CAMPOS EV, DE AZEVEDO RP, SILVA-JR JM, FERREIRA MC, SANCHES-GIRAUD C, SILVA-JR CV, SANTOS SR. Individualised vancomycin doses for paediatric burn patients to achieve PK/PD targets. *Burns* May 2013; 39(3): 445-50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22867735>
- HAGIHARA M, SUTHERLAND C, NICOLAU SD. Development of HPLC methods for the determination of vancomycin in human serum, mouse serum and bronchoalveolar lavage fluid. *J. Chromatogr. Sci.* March. 2013; 51(3):201-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22851425>
- HOOG M, MOUTON JW, ANKER JN. Vancomycin: pharmacokinetics and administration regimens in neonates. *Clin. Pharmacokinet.* Jan. 2004;43(7):417-40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15139793>
- JACQZ-AIGRAIN E, ZHAO W, SHARLAND M, VAN DEN ANKER JN. Use of antibacterial agents in the neonate: 50 years of experience with vancomycin administration. *Semin. Fetal Neonatal. Med.* Elsevier Ltd; Feb. 2013; 18(1):28-34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23137927>
- JEHL, F.; GALLION, C.; THIERRY, R. C.; MONTEIL, H. Determination of vancomycin in human serum by high-pressure liquid chromatography. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 27, n. 4, p. 503-7, 1985. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=180084&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- KIM D IL, IM MS, CHOI JH, LEE J, CHOI EH, LEE HJ. Therapeutic monitoring of vancomycin according to initial dosing regimen in pediatric patients. *Korean. J. Pediatr.* Dec. 2010; 53(12):1000-5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3021725&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- LÓPEZ KJV, BERTOLUCI DF, VICENTE KM, DELL'AQUILLA A M, SANTOS SRCJ. Simultaneous determination of cefepime, vancomycin and imipenem in human serum of burn patients by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol.*

Biomed. Life. Sci. Dec. 2007; 860(2):241-5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023625>

LUKSA J, MARUSIC A, LUKŠA J, MARUŠIČ A. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in human serum. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* May 1995; 667(2):277-81. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037843479500033F>

MCKAMY S, HERNANDEZ E, JAHNG M, MORIWAKI T, DEVEIKIS A, LE J. Incidence and risk factors influencing the development of vancomycin nephrotoxicity in children. *J. Pediatr. Mosby, Inc.*; March 2011;158(3):422-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20888013>

ONG CT, NICOLAU DE. Rationale and utility of therapeutic drug monitoring for the optimization of antibiotic therapy. *Drug Monitoring and Clinical Chemistry. Handbook of Analytical Separations, Vol. 5 Ed. Elsevier Chap. 8.* 2004: pg 212-219.

PACIFICI, G.; ALLEGAERT, K. Clinical pharmacokinetics of vancomycin in the neonate: a review. *Clinics*, v. 67, n. 7, p. 831-837, 2012. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-59322012000700021&lng=en&nrm=iso&tlng=en

ROCHA MJ, ALMEIDA AM, FALCÃO AC. Vancomycin kinetic profile in very low birth weight newborns. *Eur J Hosp Pharm Sci* 2006;12(2):29-31.

RYBAK MJ1, LOMAESTRO BM, ROTSCHAFFER JC, MOELLERING RC, CRAIG WA, BILLETER M, DALOVISIO JR, LEVINE DP. Vancomycin therapeutic guidelines: a summary of consensus recommendations from the infectious diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Clin. Infect. Dis.* August 2009;49(3):325-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19569969>

SANTOS CR, FEFERBAUM R, DE PAULA MLSA, BERTOLINE MA, OMOSAKO CEK, SANTOS SRCJ. DOS SANTOS, C. R.; FEFERBAUM, R.; DE PAULA, M. L. S. A. Micrométodo para quantificação da vancomicina em serum através da cromatografia líquida de alta eficiência. Monitorização plasmática de vancomicina na sustentação farmacológica de neonatos com sepse. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, n. 1, 2001. Available at: <http://pesquisa.bvs.br/brasil/resource/pt/lil-314072>

SHEN, A; MORGAN, L; BARROSO, M. L; ZHANG, X; NGUYEN, T;. Method Development of LC-MS/MS Analysis of Aminoglycoside Drugs: Challenges and Solutions. Tandem Labs, 2008 Available at: <http://www.tandemlabs.com/documents/ASMS08-Angela-Web.pdf>

SHIBATA N, ISHIDA M, VENKATA RAMA PRASAD Y, GAO W, YOSHIKAWA Y, TAKADA K. Highly sensitive quantification of vancomycin in serum samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and oral bioavailability in rats. *J. Chromatogr. B.* jun. 2003; 789(2):211-8. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023203000680>

SINKELER, F. S.; DE HAAN, T. R.; HODIAMONT, C. J.; et al. Inadequate vancomycin therapy in term and preterm neonates: a retrospective analysis of trough serum concentrations in relation to minimal inhibitory concentrations. *BMC pediatrics*, v. 14, p. 193, 2014. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4124772&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

TRUJILLO TN, SOWINSKI KM, VENEZIA RA, SCOTT MK, MUELLER BA. Vancomycin assay performance in patients with acute renal failure. *Intensive Care Med.* nov. 1999;25(11):1291-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10654216>

U.S. Guidance for industry on bioanalytical method validation., Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, May 2001. Available at:

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>

U.S. Vancomycin Solubility Study, Center for Drug Evaluation and Research. Food and Drug Administration 2008. Available at: [http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-](http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-drugs-gen/documents/document/ucm082291.pdf)

[drugs-gen/documents/document/ucm082291.pdf](http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-drugs-gen/documents/document/ucm082291.pdf)

ANEXO C - Laudo De Análise Do Padrão Analítico

SIGMA-ALDRICH

sigmaaldrich.com

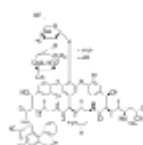
3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.comEmail USA: techserv@sigmaaldrich.comOutside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com**Certificate of Analysis**

Product Name:

Vancomycin hydrochloride hydrate

Product Number: 861987
Batch Number: SLBG4650V
Brand: ALDRICH
CAS Number: 123409-00-7
MDL Number: MFCD00151026
Formula: C₆₆H₇₅Cl₂N₉O₂₄ · HCl · xH₂O
Formula Weight: 1,485.71 g/mol
Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
Quality Release Date: 25 APR 2013
Date Retested: 03 FEB 2015
Recommended Retest Date: FEB 2017



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Orange-Brown	Off-White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless to Dark Yellow and Very Faint Orange to Faint Orange	Faint Yellow
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
50 mg/ml H ₂ O		
% Water	≤ 10.0	4.0
by Karl Fischer		
Carbon (anhydrous)	50.7 - 56.0 %	52.9 %
Nitrogen (anhydrous)	8.0 - 8.9 %	8.4 %
ug Vancomycin/mg	≥ 900	1085
Anhydrous Basis (assay/potency)		

Rodney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

ANEXO D - PROTOCOLO HOSPITALAR DE MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DA VANCOMICINA.

	<p>PROTOCOLO CLÍNICO</p> <p>DOSAGEM SÉRICA DE VANCOMICINA</p>	<p>PROTOCOLO</p> <p>Nº:</p> <p>Total de Páginas: 2</p>
---	--	--

1. INTRODUÇÃO

A Vancomicina é a droga de escolha para tratamento de sepse e infecções por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). A prescrição inadequada do glicopeptídeo, especialmente subdosagem, está associada ao desenvolvimento de cepas resistentes, aumento da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e aumento dos custos de tratamento com utilização de drogas de alto custo como a Linezolida. Outra preocupação é o risco de nefrotoxicidade e ototoxicidade da droga em concentrações séricas elevadas.

A vancomicina possui uma estreita faixa terapêutica e sua absorção apresenta grande variação entre os pacientes, que depende da função renal, peso, idade e parâmetros metabólicos. A fim de obter a dose ideal, recomenda-se além da adequação da dose empírica, o monitoramento da concentração sérica do fármaco (vancocinemia) e o cálculo do clearance de creatinina do paciente. O monitoramento da concentração sérica diminui o risco de desenvolvimento de resistência à vancomicina, toxicidade e falha da terapia.

2. OBJETIVOS

- * Estabelecer a rotina de coleta de exames para dosagem sérica de vancomicina.
- * Desenvolver e validar a metodologia analítica para determinação sérica de vancomicina.
- * Definir recomendações de ajustes de dose conforme dosagem sérica.
- * Definir critérios de acompanhamento da efetividade do tratamento com o fármaco.

3. CONDUTAS

INDICAÇÃO

- Pacientes neonatos em uso de vancomicina;
- Pacientes em uso de aminoglicosídeos e outras drogas nefrotóxicas.
- Pacientes com infecções graves como meningite, osteomielite.
- Piora da função renal.
- Pacientes obesos.
- Portadores de fibrose cística ou queimaduras.

COLETA

- Para realizar a dosagem plasmática da vancomicina é necessário coletar pelo menos 1mL de sangue em tubo de bioquímica simples e encaminhar ao laboratório com o pedido para dosagem de vancocinemia.
- A coleta deverá ser realizada em um intervalo de até 30 minutos antes da administração quarta dose ou doses subsequentes, pois o objetivo da análise é aferir o valor mínimo da droga em circulação (nível basal), após a estabilização de seu nível sérico.

AValiação DOS RESULTADOS

PRIMEIRA COLETA

A equipe deve comparar a concentração sérica mensurada no teste e com a faixa terapêutica esperada (ver tabela 2).

- Conforme o resultado devem-se avaliar os benefícios em alterar a posologia da vancomicina de forma a atingir níveis plasmáticos adequados. Uma forma de realizar esta intervenção reduzindo riscos é mudar o aprazamento da administração do fármaco, por exemplo: Uma dose que é fornecida a cada 8 horas e está com o nível sérico muito baixo, poderá ter seu intervalo alterado para a cada 6 horas.
 - Se o resultado estiver adequado à conduta deverá ser mantida.
 - Se nível plasmático elevado (> 20 mg/L): Considerar aumentar o intervalo entre as doses.
 - Se nível plasmático tóxico (>30 mg/L): Considerar substituição da droga.
 - Se nível plasmático baixo (< 5 mg/L): Considerar reduzir o intervalo entre as doses.

SEGUNDA COLETA

- Caso tenha sido realizada uma intervenção na dose, é adequado realizar uma nova prova de vancocinemia, para verificar o efeito da mudança. Novamente a coleta deverá ser realizada a coleta em até 30 minutos antes da administração da quarta dose, ou doses subsequentes do novo regime.
 - No caso de a vancocinemia continuar elevada após aumento do aprazamento, considerar diminuir a dose administrada ou trocar o antibiótico. Reavaliar em 24 horas.

- o No caso de a vancocinemia continuar baixa mesmo após diminuição do aprazamento, considerar aumento da dose ou trocar o antibiótico. Reavaliar em 24 horas.
- o Caso o resultado do segundo teste seja normal, reavaliar em 72 horas.

4. RESULTADOS ESPERADOS

1. Reduzir os riscos do tratamento com vancomicina.
2. Melhorar a efetividade no uso da vancomicina.

REFERÊNCIAS:

JACQZ-AIGRAIN, E. et al. Use of antibacterial agents in the neonate: 50 years of experience with vancomycin administration. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, v. 18, n. 1, p. 28–34, fev. 2013.

DOS SANTOS, C. R. et al. Micrométodo para quantificação da vancomicina em plasma através da cromatografia líquida de alta eficiência. *Monitorização plasmática de vancomicina na sustentação farmacológica de neonatos com sepse*. v. 37, 2001.

RYBAK, M. J. et al. Vancomycin therapeutic guidelines: a summary of consensus recommendations from the infectious diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 49, n. 3, p. 325–7, 1 ago. 2009.

MACHADO, J. K. K. et al. Monitoring the treatment of sepsis with vancomycin in term newborn infants. *Revista do Hospital das Clínicas*, v. 56, n. 1, p. 17–24, jan. 2001.

6. ANEXOS

ATUALIZAÇÕES

Nº REV.	NATUREZA DAS ALTERAÇÕES	DATA
00.	Próxima revisão	Dezembro 2015

TABELA 1 – DOSES RECOMENDADAS

Situação de uso	MIC	Dose (mg/kg)	Obs.
Empírico	-	10	
Estafilococos não produtor de coagulase	1	10	
Estafilococos não produtor de coagulase	≥ 2	15	Monitorar a creatinina a cada 48 horas
MRSA	0.5	10	
MRSA	1	15	Monitorar a creatinina a cada 48 horas
MRSA	≥ 2	-	Tratamento com Linezolida

TABELA 2 - AJUSTE DE DOSE COM BASE NO NÍVEL BASAL SÉRICO

Resultado da dosagem sérica (mg/L)	Ação sobre a vancomicina	Observação
< 10	Diminui o intervalo entre doses	Ex.: se 8/8h passa para 6/6h. Se não for possível alterar o aprazamento aumentar a dose.
10 – 15 (alvo esperado)	Manter dose	
15 a 20	Manter dose	Monitorar a creatinina a cada 48 horas
>20 até 30	Aumenta o intervalo entre doses	Ex.: se 8/8h passa para 12/12h. e Monitorar a creatinina a cada 48 horas
>30	Suspende Vancomicina	Substitui para linezolida

Todos os ajustes realizados a partir do resultado da vancocinemia -> coletar nova amostra após 24h.