



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Departamento de Química Analítica

Método Espectrofotométrico para Determinação de Vancomicina

Alvino Rodrigues Junior

Orientador: Prof. Dr. Matthieu Tubino

Campinas, Dezembro de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

R618m	Rodrigues Junior, Alvino. Método espectrofotométrico para determinação de vancomicina / Alvino Rodrigues Junior. -- Campinas, SP: [s.n], 2008. Orientador: Matthieu Tubino. Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Vancomicina. 2. Espectrofotometria. I. Tubino, Matthieu. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
-------	--

Título em inglês: Spectrophotometric method for vancomycin determination

Palavras-chaves em inglês: Vancomycin, Spectrophotometry

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestrado em Química na Área de Química Analítica

Banca examinadora: Matthieu Tubino (orientador), Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Leonardo Pezza (IQ-UNESP-Araraquara)

Data de defesa: 17/12/2008

*Dedicado à Silvia e Alvino,
por me concederem o prazer de
ser seu filho*

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação não sairia sem o apoio, o auxílio e a intercessão das mais diferentes pessoas em diversos segmentos. Assim, agradeço:

- Ao Professor Doutor Matthieu Tubino, que me aceitou em seu grupo de pesquisa em 2001 e manteve uma relação forte e constante de informações e apoio científico, e a Professora Doutora Marta Vila, que me auxiliou muito no trabalho de pesquisa na bancada e esteve sempre à disposição para a troca de idéias e experiências.
- A todo o pessoal com quem eu me relacionei e me relaciono até hoje do laboratório I-125, pelos momentos de descontração e de interação antes e durante a realização dos experimentos.
- Aos amigos de turma, companheiros desde 2000 das mais diversas situações, dentro e fora da Universidade e do Instituto de Química. André, Thaís, Lucas, Luiz, Humberto, Silvia, Aline, cada um a sua maneira me ensinou algo que aplico tanto na minha vida profissional e na vida pessoal, além de me darem o prazer da amizade sem qualquer tipo de contrapartida.
- Aos amigos e pessoas especiais que conheci fora do meu ambiente de pós-graduação, que sempre me ofereceram atenção e carinho. Em especial, agradeço à Ana Carolina e Adriana.
- Por fim, um agradecimento especial à minha mãe Silvia e meu pai Alvino, que não mediram esforços para que eu realizasse a minha caminhada com tranquilidade e sucesso, e aos meus irmãos Jader e Gilson, que cada um à sua maneira, bem peculiar e distinta, sempre me acompanharam nesta empreitada.

No mais, que esta dissertação seja reflexo não apenas do trabalho de pesquisa científico realizado, mas de todo o pensamento e desejo positivo das pessoas citadas acima. Muito obrigado por conhecê-los!

CURRICULUM VITAE

ALVINO RODRIGUES JUNIOR

DADOS PESSOAIS

Filiação: Alvino Rodrigues e Silvia Prado Rodrigues
e-mail: alvino_rodrigues@yahoo.com.br
Nacionalidade: Brasileiro
Naturalidade: Campinas – SP
Data de Nascimento: 02/10/1981

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **Graduação: Bacharelado em Química**

Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Campinas – SP (2000-2004)

- **Graduação: Bacharelado em Química – Modalidade Tecnológica**

Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Campinas – SP (2000-2004)

ATIVIDADES CIENTÍFICAS

- Auxiliar Didático na disciplina QG-102 - Química Geral. Instituto de Química – UNICAMP (04/2004 a 07/2004)
- Iniciação Científica. Título: *Determinação quantitativa de ácido acetilsalicílico em medicamentos usando sistema de injeção em fluxo com detecção condutivimétrica*. Prof. Dr. Matthieu Tubino, IQ – UNICAMP. Financiamento FAPESP (abril 2002 – março 2003)
- Iniciação Científica. Título: *Determinação espectrofotométrica de metildopa em medicamentos com sistema de análise por injeção em fluxo*. Prof. Dr. Matthieu Tubino, IQ – UNICAMP. Financiamento FAPESP (abril 2003 – dezembro 2003)

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- Rodrigues Jr., A.; Vila, M. M. D. C.; Tubino, M. *Determinação quantitativa de ácido acetilsalicílico em medicamentos usando sistema de injeção em fluxo com detecção condutivimétrica*. 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas - MG (2003)
- Rodrigues Jr., A.; Vila, M. M. D. C.; Tubino, M. *Determinação espectrofotométrica de metildopa em medicamentos com sistema de análise por injeção em fluxo*. 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Salvador - BA (2004)

- Rodrigues Jr., A.; Vila, M. M. D. C.; Tubino, M. Estudo de método espectrofotométrico para determinação de vancomicina em preparações farmacêuticas. 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Salvador - BA (2005)

ARTIGOS EM PERIÓDICOS

- Rodrigues Junior, Alvino; Vila, Marta M. D. C.; Tubino, Matthieu. **Green spectrophotometric method for the quantitative analysis of vancomycin in pharmaceuticals and comparison with HPLC.** Analytical Letters (2008), 41(5), 822-826.
- Tubino, Matthieu; Rodrigues, Alvino, Jr.; Vila, Marta M. D. C. **A simple flow injection spectrophotometric method for the determination of α - methyl dopa in pharmaceutical preparations.** Journal of Flow Injection Analysis (2004), 21(2), 132-136.
- Rodrigues, Alvino, Jr.; Vila, Marta M. D. C.; Tubino, Matthieu. **Acetylsalicylic acid determination in remedies using a gas-diffusion flow injection analysis-II+.** Journal of Flow Injection Analysis (2004), 21(1), 25-27.
- Vila, Marta M. D. C.; Tubino, Matthieu; Matias, Francisco A. A.; Rodrigues, Alvino, Jr.. **Acetylsalicylic acid determination in remedies using a gas-diffusion/flow injection analysis.** Journal of Flow Injection Analysis (2002), 19(1), 29-34

ATIVIDADE PROFISSIONAL

- Dow AgroSciences (agosto 2008 – atual): Validação de métodos analíticos para quantificação de agroquímicos por LC-MS/MS; Desenvolvimento de metodologias de extração e quantificação de novas substâncias.
- Eurofins do Brasil (fevereiro 2006 – agosto 2008): Implementação de laboratório de análise de micotoxinas; Adequação e validação de métodos de análise; Cálculo de resultados e emissão de relatórios de ensaio.

RESUMO

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE VANCOMICINA

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um método analítico quantitativo de para análise de vancomicina (em sua forma denominada vancomicina base - VCM, e na forma de cloridrato de vancomicina - HVCM), com utilização de espectrofotometria na região do visível. O método tem como princípio a reação da vancomicina com íons cobre(II), resultando na formação de um complexo de coloração lilás, que apresenta absorção máxima em 555 nm.

Realizaram-se estudos para a otimização da reação entre a vancomicina e o íon cobre(II). Dentre estes fatores, destacam-se: a escolha do sal de cobre(II) utilizado na reação com vancomicina; a utilização de etanol, no preparo das soluções e como componente do meio reacional; pH do meio reacional; proporção molar entre vancomicina e íon cobre(II).

A otimização destes parâmetros resultou em um método com faixa de trabalho de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com coeficiente de correlação de 0,9997 e limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) de $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

O método proposto também foi estudado em relação à recuperação de vancomicina frente a excipientes comumente utilizados na indústria farmacêutica. Os resultados obtidos foram comparados com método de referência cromatográfico, onde foi observado que o método proposto apresentou maior repetibilidade para as amostras de HVCM e maior recuperação para as amostras de VCM.

O procedimento para a realização de análises pelo método proposto é de fácil execução e de baixo custo.

ABSTRACT

SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR VANCOMYCIN DETERMINATION

The aim of this work was to develop a quantitative spectrophotometric analytical method, in the visible region of the spectrum, for the determination of vancomycin (in the form known as base – VCM, and in the form of chloridrate, HVCM).

The developed method uses the reaction between vancomycin and ions copper(II) that forms a lilac complex which spectrum shown a maximum at 555 nm.

Studies were done in order to optimize the method. Among them can be cited: selection of the copper(II) salt to be used in the reaction with vancomycin; use of ethanol as component of the reaction for the preparation of the solution and as component of the reaction medium; pH of the reaction medium; molar proportion between vancomycin and copper(II) ions.

The parameters optimization resulted in a method with a linear range from $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ to $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, with correlation coefficient value of 0,9997, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values of $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ and $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectively.

The proposed medium was also studied with respect to the vancomycin recovering when mixed with excipients commonly used in the pharmaceutical industry. The obtained results were compared with those of the reference chromatographic method (HPLC), where it was observed the proposed method showed a better reproductibility for HVCM samples and higher recoveries for VCM samples.

The analytical procedure that is proposed in this work is simple to be performed and the cost is very low.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Figuras.....	xiv
Capítulo 1 – Objetivos.....	1
Capítulo 2 – Introdução.....	3
2.1 Vancomicina.....	4
2.2 Mecanismo de ação.....	6
2.3 Uso terapêutico e efeitos colaterais.....	7
2.4 Identificação e quantificação da vancomicina.....	8
2.4.1 Métodos cromatográficos.....	8
2.4.2 Métodos imunológicos.....	9
2.4.3 Métodos biológicos.....	10
2.4.4 Métodos espectrofotométricos.....	11
2.4.5 Outros métodos.....	12
2.5 Outras aplicações.....	12
Capítulo 3 – Material e Métodos.....	14
3.1 Estudos Iniciais.....	15
3.1.1 Equipamentos.....	15
3.1.1.1 Análise Elementar.....	15
3.1.1.2 Espectrofotometria na região do infravermelho (FT-IR).....	15
3.1.1.3 Calorimetria diferencial por varredura.....	15

3.1.1.4	Análise termogravimétrica.....	15
3.2	Método Espectrofotométrico.....	15
3.2.1	Equipamentos.....	15
3.2.1.1	Espectrofotômetro.....	15
3.2.1.2	pHmetro.....	15
3.2.1.3	Centrífuga.....	16
3.2.2	Reagentes.....	16
3.2.3	Soluções.....	16
3.2.3.1	Solução acetato de sódio 2,0 mol L ⁻¹	16
3.2.3.2	Solução ácido acético 2,0 mol L ⁻¹	16
3.2.3.3	Solução tampão HAc/Ac ⁻ pH 3,5.....	16
3.2.3.4	Solução tampão HAc/Ac ⁻ pH 4,5.....	16
3.2.3.5	Mistura etanol-solução tampão HAc/Ac ⁻ em pH 3,5.....	17
3.2.3.6	Mistura etanol-solução tampão HAc/Ac ⁻ em pH 4,5.....	17
3.2.3.7	Solução estoque de vancomicina.....	17
3.2.3.8	Solução estoque de cloridrato de vancomicina.....	17
3.2.3.9	Solução de acetato de cobre(II) 0,06 mol L ⁻¹ ...	17
3.2.3.10	Solução de ácido clorídrico 1 mol L ⁻¹	18
3.2.3.11	Solução de ácido clorídrico 0,1 mol L ⁻¹	18
3.2.3.12	Solução de NaOH 0,1 mol L ⁻¹	18
3.2.4	Preparo de amostras contendo excipientes.....	18
3.3	Procedimento experimental.....	18
3.3.1	Análise Elementar.....	18

3.3.2 Espectrofotometria na região do Infravermelho (FT-IR).....	18
3.3.3 Análises de DSC e TGA.....	19
3.3.4 Desenvolvimento do Método Espectrofotométrico.....	19
3.3.5 Construção da Curva Analítica.....	20
3.3.6 Tratamento das amostras de VCM e HVCM.....	21
3.3.6.1 Amostras puras de VCM e HVCM.....	21
3.3.6.2 Amostras sintéticas.....	21
3.3.6.3 Reação com solução de cobre(II).....	24
3.3.7 Estudos de especificidade.....	24
Capítulo 4 – Resultados e Discussão.....	25
4.1 Introdução.....	26
4.2 Análise Elementar.....	26
4.3 DSC e TGA.....	27
4.4 Infravermelho (FT-IR).....	32
4.5 Desenvolvimento do Método.....	36
4.5.1 Estudo da influência dos contra-íons dos sais de Cobre(II) e dos solventes.....	36
4.5.2 Proporção molar.....	43
4.5.3 Temperatura.....	45
4.5.4 pH.....	47
4.5.5 Estabilidade da solução do complexo.....	49
4.5.6 Curvas analíticas e figuras de método.....	53
4.5.7 Especificidade.....	58
Capítulo 5 – Conclusão.....	59
Capítulo 6 – Perspectivas.....	61
Capítulo 7 – Referências.....	63

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio encontrados nos fármacos HVCM e VCM utilizados neste trabalho e seus valores teóricos.....27
- Tabela 2.** Resultados de solubilidade, pH e reação com HVCM em água dos sais de cobre (II).....42
- Tabela 3.** Intervalo de tempo necessário para o início da precipitação do complexo formado em função da temperatura da solução de acetato de cobre(II) 0,02 mol L⁻¹ em água-etanol 50%, reagindo com solução de HVCM 0,01 mol L⁻¹ em água.....46
- Tabela 4.** Variação dos valores de absorbância, em 555 nm, da reação de soluções de acetato de cobre(II) 0,060 mol L⁻¹, em diferentes valores de pH (pH 3,5 e pH 4,5), com soluções de VCM com pH 3,5..... 48
- Tabela 5.** Valores de absorbância obtidos da reação de soluções de HVCM e VCM 0,02 mol L⁻¹ com diferentes teores de etanol, com acetato de cobre(II) 0,06 mol L⁻¹ em tampão HAC/Ac⁻ pH 4,5, água-etanol 50 % v/v.....49
- Tabela 6.** Valores de recuperação de VCM e HVCM, em porcentagem, na presença de diferentes excipientes, pelo método proposto e pelo método de referência.....56
- Tabela 7.** Comparação estatística entre os resultados obtidos para os dois métodos (tabela 6) usando os desvios padrão admitidos para os dois métodos com base no critério de tolerância de precisão de 5% para análise de fármacos.....58

Lista de Figuras

Figura 1. Fórmula estrutural da vancomicina (The Merck Index, 1996).....	5
Figura 2. Ligação da vancomicina com a terminação da parede celular bacteriana.....	6
Figura 3. Esquema do processo de extração de VCM e HVCM em amostras contendo excipientes.....	23
Figura 4. Gráfico de DSC da molécula de VCM.....	28
Figura 5. Gráfico de DSC da molécula de HVCM.....	29
Figura 6. Termograma da molécula de VCM.....	30
Figura 7. Termograma da molécula de VCM.....	31
Figura 8. Espectros na região do infravermelho médio de VCM e HVCM.....	34
Figura 9. Espectros na região do infravermelho médio ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) de HVCM após A) 5 dias e B) 7 dias de secagem com pentóxido de fósforo.....	35
Figura 10. Espectros do produto da reação de HVCM $0,02\text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) em água com acetato de cobre(II) $0,02\text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) em: água, acetonitrila e etanol. Branco: mistura de solução acetato de cobre(II) $0,02\text{ mol L}^{-1}$ (1,5 ml) com água (1,5 mL) no solvente adequado com água para obter uma solução 50 % v/v.....	37

Figura 11. Espectros do produto da reação de HVCM $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) em água com cloreto de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) em: água, acetonitrila e etanol. Branco: mistura de solução acetato de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 ml) com água (1,5 mL) no solvente adequado com água de modo a obter uma solução 50 % v/v.....38

Figura 12. Espectros do produto da reação de HVCM $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) em água com nitrato de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) em: água, acetonitrila e etanol. Branco: mistura de solução acetato de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 ml) com água (1,5 mL) no solvente adequado com água de modo a obter uma solução 50 % v/v.....39

Figura 13. Espectros do produto da reação de HVCM $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) em água com sulfato de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) em: água, acetonitrila e etanol. Branco: mistura de solução acetato de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 ml) com água (1,5 mL) no solvente adequado com água de modo a obter uma solução 50 % v/v.....39

Figura 14. Espectros na região do ultravioleta-visível, de soluções de acetato, cloreto, nitrato e sulfato de cobre(II) em etanol, em água e em acetonitrila. A concentração dos sais é igual a $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ 40

Figura 15. Representação das ligações entre o íon cobre(II) com a molécula de vancomicina em meio aquoso (Nair et al., 1996).....41

Figura 16. Espectros do complexo formado na reação entre acetato de cobre (II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ em etanol (1,5 mL) com HVCM em água (1,5 mL) em diferentes concentrações. (Branco: mistura de 1,5 mL de etanol com 1,5 mL de água).....44

Figura 17. Tempo para o início da precipitação do complexo HVCM- Cu^{2+} , em relação a temperatura da solução de acetato de cobre(II). Solução de HVCM mantida em 5 °C.....47

Figura 18. Absorbância de reações de HVCM com soluções de acetato de cobre(II) em diferentes concentrações, em função do tempo. Medidas feitas a cada 30 segundos, em $\lambda = 555 \text{ nm}$. Branco: 1,5 mL solução tampão HAc/ Ac^- , água-etanol 50 % v/v, pH 3,5 com 1,5 mL solução tampão HAc/ Ac^- , água-etanol 50 % v/v, pH 4,5.....50

Figura 19. Variação da absorbância da reação entre HVCM $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de cobre(II) $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{max}} = 555 \text{ nm}$). HVCM em solução tampão HAc/ Ac^- pH 3,5, água-etanol 50 % v/v,, com adição de HCl ou NaCl e acetato de cobre(II) em solução tampão HAc/ Ac^- , água-etanol 50 % v/v, pH 4,5. Leitura da absorbância a cada 30 segundos.....52

Figura 20. Curva analítica com soluções de HVCM e VCM preparadas em solução tampão HAc/ Ac^- , água-etanol 50 % v/v, pH 3,5. Reação com acetato de cobre(II) $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão HAc/ Ac^- , água-etanol 50 % v/v, pH 4,5, $\lambda = 555 \text{ nm}$, branco 1,5 mL de solução tampão HAc/ Ac^- , água-etanol 50 % v/v, pH 3,5 misturado com 1,5 mL de solução tampão HAc/ Ac^- , água-etanol 50 % v/v, pH 4,5 $y = 0,12 + 75,5 C$; Limite de detecção (LOD): $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; Limite de quantificação (LOQ): $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; Coeficiente de correlação: 0,9997.....54

Capítulo 1

Objetivos

1. Objetivos

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um procedimento analítico quantitativo para a análise de vancomicina (em sua forma pura, denominada vancomicina base - VCM, e na forma de cloridrato de vancomicina - HVCM), através do método de espectrofotometria. O método tem como princípio a reação da vancomicina com íons cobre(II), resultando na formação de um complexo de coloração lilás, que apresenta absorção máxima em 555 nm.

Capítulo 2

Introdução

2.1 Vancomicina

O fármaco vancomicina, $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$, é um antibiótico do grupo dos glicopeptídeos, isolado por cientistas do laboratório Ely Lilly & Co em 1956, a partir do processo de fermentação realizado por culturas de *Streptomyces orientalis* (posteriormente denominado como *Amycolatopsis orientalis*), microrganismo encontrado em amostras de solo coletadas em regiões da Índia e Indonésia (Nicolaou e Snyder, 2003). O nome vancomicina baseia-se no inglês *vanish*, que significa desaparecer, tendo sido escolhido devido à sua grande eficácia como bactericida. Esta eficiência levou a sua aprovação para uso clínico apenas dois anos após sua descoberta, por representar uma alternativa para o tratamento de infecções causadas pelo estafilococo produtor de penicilinase que é resistente à ação da penicilina G e à falta de medicamentos disponíveis no mercado com esta característica e tempo curto de ação.

Entretanto, a descoberta da meticilina, da oxacilina e de outras isoxazotilpenicilinas fez diminuir a importância médica da vancomicina, devido à sua maior toxicidade (Tavares, 2002). A discussão sobre os prós e contras de sua utilização no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* voltou a ficar em evidência devido ao desenvolvimento, de cepas deste microrganismo, resistentes à meticilina (Levine, 2006; Lopes, 2007).

A vancomicina apresenta novamente posição de importância na terapêutica anti-infecciosa nos dias atuais, devido ao surgimento e disseminação dos estafilococos resistentes à meticilina, e por sua eficácia no combate às infecções causadas por *Clostridium difficile*, responsável por colites resultantes do uso de antibióticos, além de ser agente primário do surgimento de enterocolites pseudomembrânicas. Dentre os motivos de sua escolha podem ser citados, ainda, a sua pouca absorção pelo trato intestinal (Levine, 2006), e por se tratar de uma substância alternativa para pacientes alérgicos à antibióticos β -lactâmicos, como cefalosporinas e penicilina. O seu consumo em 2001 movimentou cerca de 1 bilhão de dólares (Tunnemann et al., 2001). Este valor deve ser, pelo menos, o

mesmo atualmente, por se tratar de um antibiótico restrito ao uso hospitalar e por ser uma alternativa aos antibióticos de uso mais corrente.

A vancomicina é caracterizada por possuir uma complexa estrutura tricíclica (dois anéis contendo 16 membros e o outro 12 membros), estando estes ciclos conectados por sete ligações peptídicas (figura 1). Sua fórmula estrutural foi determinada somente no final dos anos 70, por análises de raios-X (Sheldrick et al., 1978). A vancomicina exerce ação contra cocos e bacilos Gram positivos, como *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces orientalis* e *Staphylococcus epidermidis* (Kirk-Othmer, 1978; Ullmann's, 1985). Atua como antagonista competitivo da polimerização da cadeia de peptideoglicano, formador da parede celular, afetando sua permeabilidade e inibindo a síntese de RNA (ácido ribonucléico) (Gerhard et al., 1993; Pearce et al., 1995; Pearce e Williams, 1995; Schäfer et al., 1996; McPhail & Cooper, 1997; Heck et al., 2001; Srinivasan et al., 2002; Tavares, 2002)

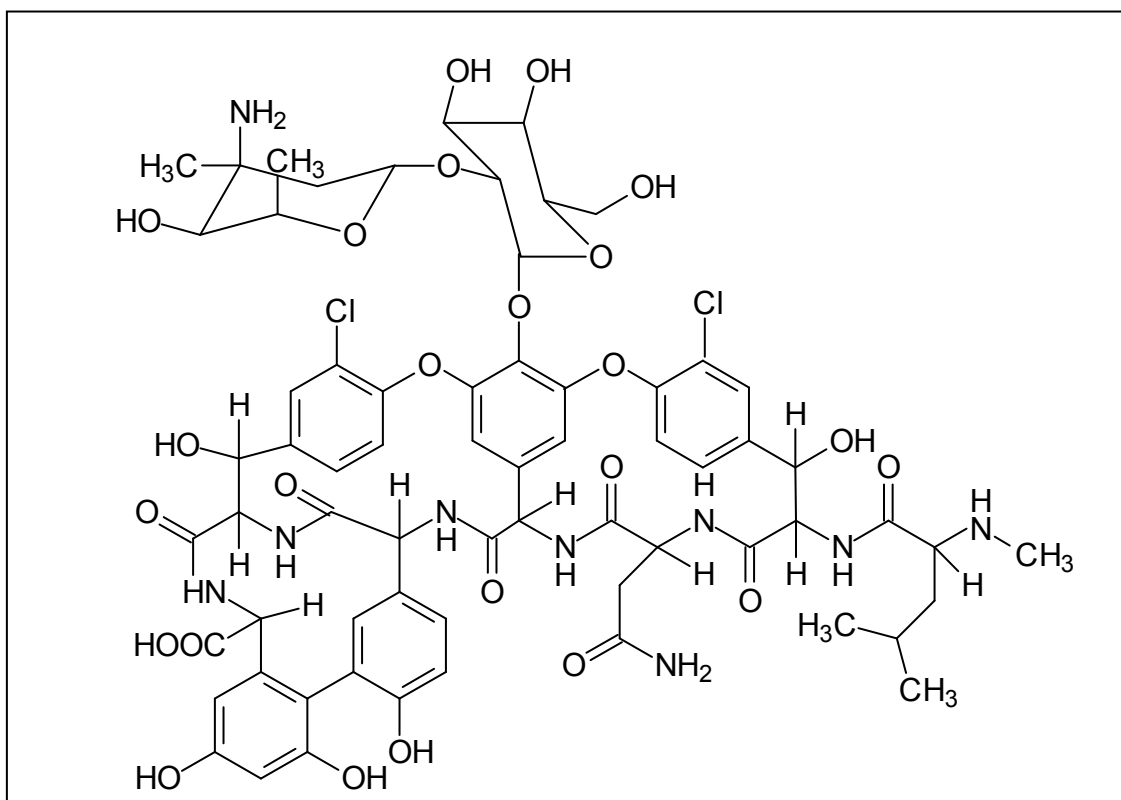


Figura 1. Fórmula estrutural da vancomicina (The Merck Index, 1996).

2.2 Mecanismo de ação

A eficácia da vancomicina contra cocos e bacilos Gram positivos, como *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces orientalis* e *Staphylococcus epidermidis* (Kirk-Othmer, 1978; Ullmann's, 1985) é devida à sua propriedade de formar uma rede de cinco ligações de hidrogênio com a porção protéica da cadeia de peptidoglicano durante a formação da parede celular bacteriana, especificamente na sequência terminal formada por lisina e duas moléculas de alanina, L-Lis-D-Ala-D-Ala (figura 2), afetando sua polimerização, comprometendo a formação da parede celular (Nicolaou e Snyder, 2003), alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática e interferindo na síntese de RNA (Gerhard et al., 1993; Pearce et al., 1995; Pearce e Williams, 1995; Schäfer et al., 1996; McPhail & Cooper, 1997; Heck et al., 2001; Srinivasan et al., 2002; Tavares, 2002).

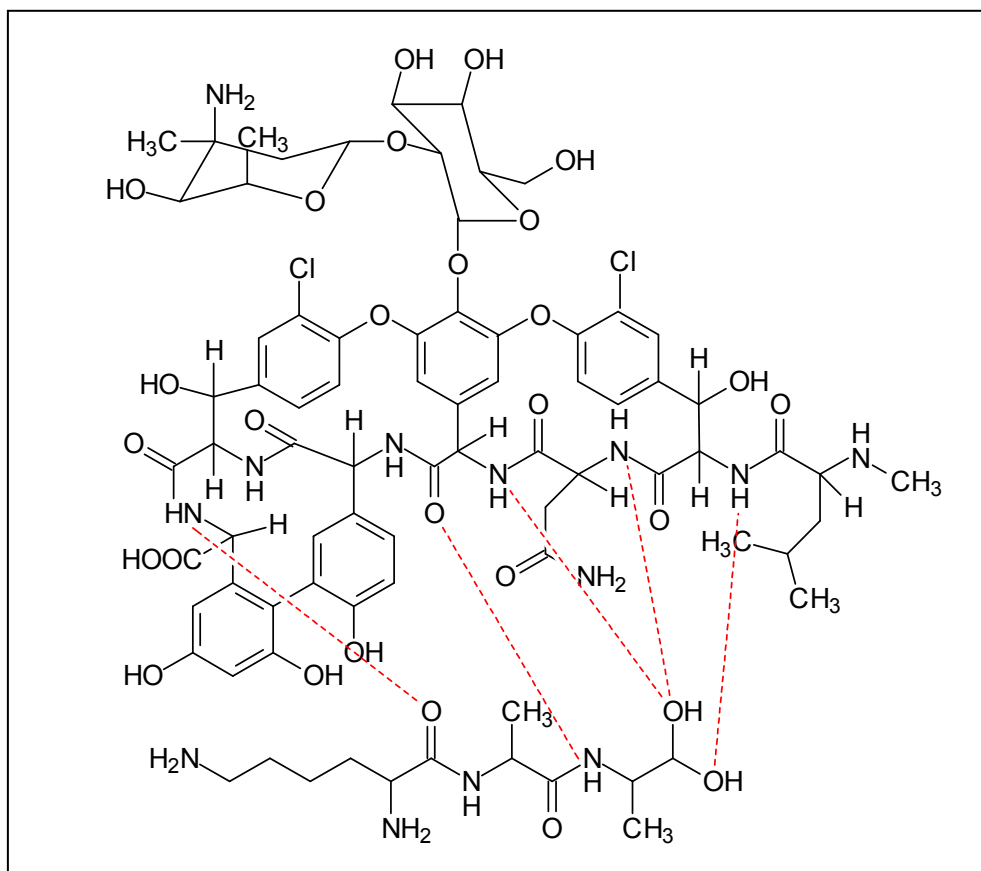


Figura 2. Ligação da vancomicina com a terminação da parede celular bacteriana.

A resistência à vancomicina surge quando a bactéria substitui, através de enzimas, uma molécula de alanina por uma de lactato, resultando na terminação L-Lis-D-Ala-D-Lac. Com esta terminação, a vancomicina se liga a parede celular através de quatro ligações de hidrogênio, resultando em perda de 20 % de interação com o peptidoglicano, o que implica na diminuição da potência antibiótica por um fator de 1000 (Nicolaou e Snyder, 2003).

2.3 Uso terapêutico e efeitos colaterais

A via de administração recomendada para a vancomicina é a intravenosa, pois a vancomicina é pouco absorvida por via oral e a introdução intramuscular pode provocar dor, hipersensibilidade e até necrose no tecido muscular. A concentração sérica recomendada para o tratamento de infecções causadas pela maioria dos microrganismos Gram positivos, situa-se na faixa de 5-10 mg L⁻¹. Valores superiores são considerados potencialmente tóxicos (Hammett-Stabler & Johns, 1998).

Recomenda-se, para que a toxicidade da droga seja evitada ou reduzida, que concentrações séricas sejam mantidas abaixo de 40 mg mL⁻¹ (Tobin et al., 2002). Entretanto, diversas controvérsias existem em relação às indicações para a dosagem sérica rotineira da vancomicina. Considera-se, de modo geral, que para pacientes adultos com funções renais normais não seja necessário monitoramento diário, sendo tal monitoramento recomendado para os pacientes com alterações da função renal, especialmente para aqueles com terapia combinada de outro aminoglicosídeo ou outra droga nefrotóxica, para pacientes sob diálise renal, para manutenção da dose eficaz, pacientes com volumes de distribuição alterados, como pacientes queimados, pacientes recém nascidos ou pediátricos, mulheres grávidas, pacientes com doenças malignas; pacientes em tratamento prolongado com vancomicina e para aqueles que necessitam doses elevadas do antibiótico (Freeman et al., 1993; Hammett-Stabler & Johns, 1998; Begg et al., 2001).

Os maiores problemas resultantes do tratamento com vancomicina residem na sua neurotoxicidade, manifestada por danos ao nervo auditivo com perda reversível ou não da audição, e nefrotoxicidade, reportada em 5 a 7% dos pacientes. Esta porcentagem pode se elevar em até 35%, quando em associação com aminoglicosídeos. No entanto, a nefrotoxicidade surge com maior frequência se a concentração sanguínea excede 10 mg mL^{-1} . Um outro efeito colateral ocasionado pela ação da vancomicina é a chamada Síndrome do Pescoço Vermelho (“Red-neck syndrome”), que pode ocorrer em até 47% dos pacientes. A reação é caracterizada por eritema nas faces, pescoço e extremidades superiores. Isto se deve à liberação de histamina por administração intravenosa rápida. Em casos esporádicos, podem ocorrer tromboflebites, febres, urticária e neutropenia (Hammett-Stabler & Johns, 1998; Davani et al., 2002).

Assim, existe a necessidade da dosagem de vancomicina em fluídos corpóreos para o ajuste de dose eficaz que permita eficiência de tratamento com menores efeitos colaterais possíveis. Soma-se a isto, a necessidade do controle de qualidade destes fármacos durante sua produção e estocagem.

2.4 Identificação e quantificação da vancomicina

2.4.1 Métodos cromatográficos

Inicialmente, as primeiras técnicas desenvolvidas para a identificação de vancomicina utilizavam o método de cromatografia em papel (Betina, 1963; British Pharmacopeia, 1963), passando também por cromatografia em camada delgada, em fase normal e reversa (Nowakowska et al., 2002). Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) tem sido a técnica cromatográfica mais empregada na análise de vancomicina, sendo inclusive, método oficial de determinação de pureza (British Pharmacopeia, 2002; USP, 2005) e método de controle de qualidade para laboratórios farmacêuticos produtores de vancomicina, atingindo limites de detecção entre 100 a $0,007 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, de acordo com a matriz analisada. (Jehl et al., 1985; Shibata et al., 2003).

Encontra-se na literatura, para a análise de vancomicina, métodos de cromatografia líquida de alta eficiência com o uso principalmente de coluna de fase reversa, como C₁₈, variadas fases móveis e detector de UV, trabalhando numa faixa bastante variável de comprimento de onda que vai desde 198 nm (Del Nozal et al., 1996) até 282 nm (Farin et al., 1998). O método de HPLC tem sido empregado tanto para a dosagem deste antibiótico no produto “puro” (Kirchmeier & Upton, 1978; Inman, 1987; Forlay-Frick et al., 2002; Diana et al., 2003), como para a dosagem em fluídos biológicos (Jehl et al., 1985; Bauchet et al., 1987; Hosotsubo, 1989; Hu et al., 1990; Demotes-Mainard et al., 1994; Najjar et al., 1995; Li et al., 1995; Luksa & Marusic, 1995; Del Nozal et al., 1996; Farin et al., 1998; Favetta et al., 2001; Santos et al., 2001; Metz et al., 2002; Shibata, 2003; Cass et al., 2003).

Outros detectores empregados em cromatografia líquida de alta eficiência são o detector eletroquímico (Favetta et al., 2001) e o espectrômetro de massa (Shibata et al., 2003, Ghassempour et al., 2001).

2.4.2 Métodos imunológicos

Os métodos de fluorescência polarizada (Pohlod et al., 1984; Bowhay et al., 1997; Adamczyk et al., 1998; Azzazy et al., 1998; Hermida et al., 2001), radioimunoensaio (Crossley et al., 1980; Fong et al., 1981; Blouin et al., 1982; Ackerman et al., 1983) e enzima imunoensaio múltiplo (Anne et al., 1988; Yeo et al., 1988) são exemplos de métodos imunológicos empregados para quantificação de vancomicina. As técnicas de imunoensaio múltiplo e imunoensaio de fluorescência polarizada são realizadas, normalmente, através do emprego de “kits” comerciais e analisadores automáticos, tais como o kit desenvolvido pelo laboratório Abbott, “AxSYM VancomycinIII Assay®”, apresentando como vantagem a ausência de reações cruzadas com produtos de degradação cristalinos e interferência mínima de substâncias endógenas. Estes procedimentos oferecem sensibilidade, seletividade, rapidez de análise, além de redução de contato humano com amostras biológicas, embora haja a dependência em relação às

empresas detentoras do direito de comercialização. A técnica de imunoensaio de fluorescência polarizada tem sido apontada como a mais rotineira para análise de vancomicina em amostras biológicas, sendo empregada em larga escala em hospitais (Tobin et al., 2002).

No que se refere à técnica de radioimunoensaio, embora ela tenha apresentado resultados confiáveis na dosagem de vancomicina, não tem sido observada a continuidade dos estudos, talvez em função do uso de substâncias de difícil manuseio (Ackerman et al., 1983).

De modo geral, os métodos imunológicos mais sensíveis atuam em uma faixa de concentração de vancomicina entre 1 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4.3 Métodos biológicos

A quantificação de antibióticos pode ser realizada com o uso de métodos biológicos com aplicação de discos de difusão e turbidimetria.

Para o uso de discos de difusão, realiza-se uma correlação entre a concentração aplicada de antibiótico e o diâmetro de zona obtido devido à inibição do antibiótico. A faixa de concentração de vancomicina que estas técnicas detectam fica entre 1 a 16 mg mL^{-1} , de acordo com o microrganismo empregado.

Os métodos microbiológicos, apesar de serem métodos de baixo custo, quando comparados com outros métodos de análise da vancomicina, são muito demorados, podendo variar, dependendo do procedimento envolvido, entre 4 a 5 horas de incubação a 35 °C (Walker & Kopp, 1978), 6 a 8 horas a 37 °C (Crossley et al., 1980; Pohlod et al., 1984) ou até 16 a 18 horas entre 35-37 °C (Ristuccia et al., 1984; Walker, 1980; Kureishi et al., 1990). Além disto, verifica-se falta de sensibilidade e reprodutibilidade. Assim, estes métodos não são usados, de modo rotineiro, para a dosagem de vancomicina.

2.4.4 Métodos espectrofotométricos

Dos métodos espectrofotométricos para a dosagem de vancomicina, um dos primeiros foi desenvolvido por Fooks et al (1968). O método é baseado na reação do reagente de Folin-Ciocalteu com grupamentos fenólicos da vancomicina gerando um complexo colorido com absorção máxima em 725 nm. Contudo, este reagente não é específico para a vancomicina, podendo reagir com outras moléculas que contêm grupos fenólicos.

O levantamento bibliográfico realizado para esta dissertação indica que há, na literatura, poucos métodos espectrofotométricos para a análise da vancomicina. Dentre estes pode ser citado o trabalho de El-Ashry et al. (2000), onde é proposto um método baseado na medida de espécie colorida, produzida pela reação do antibiótico com benzocaina, com absorção máxima em 443 nm. A faixa de concentração para aplicação analítica situa-se entre 2 e 18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de vancomicina, com limite de detecção de 0,0156 μg .

Outra técnica de quantificação de vancomicina que utiliza método espectrofotométrico foi o trabalho desenvolvido por Belal et al. (2001). Ele se baseia na formação de um derivado nitroso do antibiótico, após reação de ácido nítrico com um dos grupos fenólicos da molécula, sob aquecimento, com determinação espectrofotométrica, ou polarográfica do composto formado. A faixa de trabalho situa-se entre 4 e 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para vancomicina, com limite de detecção de 2,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a detecção espectrofotométrica.

Mais recentemente, foram apresentados três procedimentos experimentais de análise espectrofotométrica para vancomicina. Eles têm como princípio a oxidação do antibiótico com excesso de metaperiodato de sódio com formação de espécies detectáveis espectrofotometricamente (Sastry et al., 2002), com faixa de trabalho entre 1,15 a 5,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O maior inconveniente destes procedimentos propostos reside no tempo de reação de cerca de 40 minutos sob aquecimento. Embora, a vancomicina sofra degradação a 37 °C (White et al., 1988), o método, segundo o relatado pelos autores, não sofre qualquer interferência da temperatura.

Os métodos espectrofotométricos, de modo geral, apresentam a vantagem de serem acessíveis, de baixo custo e de fácil manuseio. Porém, apresentam como desvantagem em alguns trabalhos o longo tempo de análise, e o fato dos valores de limite de detecção obtidos serem insuficientes para quantificação de vancomicina em fluidos biológicos, sua maior aplicação se encontra na quantificação do fármaco em preparações farmacêuticas.

2.4.5 Outros métodos

Dentre outras metodologias desenvolvidas para quantificação de vancomicina, além do uso de polarografia citado no trabalho de Belal et al. (2001), destaca-se o método potenciométrico, que foi utilizado em estudos envolvendo formação de complexo da vancomicina com íons metálicos (Chabenat et al., 1983). Os autores verificaram as condições para a formação de um complexo estável entre vancomicina e cobre (II), complexo monitorado com eletrodo íon-seletivo em sistema de fluxo.

Outras técnicas utilizadas para a dosagem de vancomicina aplicam a eletroforese capilar (Lam & Le, 2002; Shamsi, 2002), e a eletrocinética capilar (Kitahashi & Furuta, 2001) como método de detecção. Estes apresentam interessantes vantagens como a pequena quantidade de amostra e a rapidez de análise, oferecendo, ainda, resultados bastante satisfatórios de limite de detecção e de linearidade ($1,0$ a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, no caso da eletrocinética capilar).

2.5 Outras aplicações

A vancomicina também tem sido empregada na área analítica como um componente importante no desenvolvimento de colunas cromatográficas utilizadas na separação de misturas racêmicas em HPLC (Armstrong et al., 1994), tornando-se uma alternativa às fases quirais estacionárias de aminoácidos e ciclodextrinas. A enantioseletividade da vancomicina acontece através de mecanismos como

complexação de elétrons π - π , ligação de hidrogênio, interações estéricas, ou a combinação desses fatores. O principal sítio envolvido na separação enantioseletiva é a amina secundária presente no ciclo da molécula denominado *aglycon*, conforme apresentado em trabalho de Nair et al. (1996). Recentemente, a vancomicina foi aplicada na eletroforese capilar para separação diferenciada de enantiômeros, recobrando a parede do capilar em associação com moléculas poliméricas (Wang et al., 2007). A molécula de vancomicina pode ser usada como referência para classificação de colunas cromatográficas de HPLC quanto a parâmetros de seletividade e fatores de retenção (Haghedooren et al., 2007).

Publicações recentes na literatura mostram diferentes linhas de pesquisa relacionadas à molécula de vancomicina, tais como a interação da vancomicina com ligantes peptídicos e o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à química combinatória (Tseng et al., 2007), formação de dímeros através de ligantes e íons metálicos, e seu impacto na atividade antimicrobiana (Kucharczyk et al., 2008) e a utilização de produtos de degradação da vancomicina para separação enantioseletiva de misturas racêmicas (Ghassempour et al., 2008).

Capítulo 3

Parte Experimental

3.1 Estudos Iniciais

3.1.1 Equipamentos

3.1.1.1 *Análise Elementar*: Equipamento Perkin Elmer Elemental Analyzer modelo PE 2400.

3.1.1.2 *Espectrofotometria na região do infravermelho (FT-IR)*: Espectrofotômetro Bomem FT-IR MB Series, modelo B100, resolução de 4 cm^{-1} .

3.1.1.3 *Calorimetria diferencial por varredura*: Equipamento TA Instruments modelo DSC 2910 Differential Scanning Calorimetry.

3.1.1.4 *Análise termogravimétrica*: Equipamento TA Instruments modelo 2050 Thermogravimetric Analyzer.

3.2 Método Espectrofotométrico

3.2.1 Equipamentos

3.2.1.1 *Espectrofotômetro*: foram utilizados dois espectrofotômetros: um Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000, para obtenção de espectros na região do UV-Visível da vancomicina e seus complexos e acompanhamento da absorbância em função do tempo durante intervalos regulares. O outro equipamento utilizado foi um Femto, modelo 600S, para realização das análises e estudo da influência dos excipientes na recuperação do método. Nos dois aparelhos foram utilizadas celas de quartzo (marca Hellma), com caminho óptico de 1,000 cm.

3.2.1.2 *pHmetro*: Analyser, modelo pH 300.

3.2.1.3 Centrífuga: Fanem, modelo Excelsa 206 BL.

3.2.2 Reagentes

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico, com exceção da vancomicina base e do cloridrato de vancomicina, que eram produtos farmacêuticos certificados (com grau de pureza de 94,7 % para vancomicina base e 96,8 % para cloridrato de vancomicina). Estes produtos foram gentilmente cedidos pela Antibióticos do Brasil Ltda. A água utilizada no preparo de soluções e em diluições foi destilada em sistema de destilação de vidro e deionizada em aparelho MilliQ® (Millipore, MA, EUA).

3.2.3 Soluções

3.2.3.1 Solução acetato de sódio $2,0 \text{ mol L}^{-1}$: dissolução de 164 g em 1000 mL de água em balão volumétrico.

3.2.3.2 Solução ácido acético $2,0 \text{ mol L}^{-1}$: 121 mL de ácido acético glacial foram diluídos para 1000 mL com água em um balão volumétrico.

3.2.3.3 Solução tampão HAc/Ac⁻ (ácido acético/acetato) pH 3,5: misturou-se 6,4 mL de solução de acetato de sódio $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (3.2.3.1) com 93,6 mL de ácido acético $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (3.2.3.2) em um balão volumétrico de 1000 mL, completando-se o volume com água.

3.2.3.4 Solução tampão HAc/Ac⁻ (ácido acético/acetato) pH 4,5: 43,0 mL de solução de acetato de sódio $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (3.2.3.1) com 57,0 mL de ácido acético $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (3.2.3.2) em um balão volumétrico de 1000 mL, completando-se o volume com água.

3.2.3.5 Solução tampão HAc/Ac⁻, água-etanol 50 % v/v, pH 3,5: 50 mL de solução tampão HAc/Ac⁻ pH 3,5 em água (3.2.3.3) foram colocados em um balão volumétrico de 100 mL sendo o volume completado até a marca do balão com etanol absoluto.

3.2.3.6 Solução tampão HAc/Ac⁻, água-etanol 50 % v/v, pH 4,5: 50 mL de solução tampão HAc/Ac⁻ pH 4,5 em água (3.2.3.4) foram colocados em um balão volumétrico de 100,0 mL sendo o volume completado até a marca do balão com etanol absoluto.

3.2.3.7 Solução estoque de vancomicina: 283,0 mg de vancomicina base (VCM) foram dissolvidas em 5 mL de solução tampão HAc/Ac⁻ de pH 3,5 (3.2.3.3) em balão volumétrico de 10,0 mL, completando o volume do balão com etanol absoluto. Esta solução, considerando a pureza do antibiótico, equivale a uma concentração de VCM de 0,02 mol L⁻¹.

3.2.3.8 Solução estoque de cloridrato de vancomicina: 290,0 mg de cloridrato de vancomicina (HVCM) foram dissolvidas em 5 mL de solução tampão HAc/Ac⁻ pH 3,5 (3.2.3.3) em balão volumétrico de 10,0 mL, completando o volume com etanol absoluto. Esta solução, considerando a pureza do antibiótico, equivale a uma concentração de HVCM de 0,02 mol L⁻¹.

As soluções estoque de VCM e HVCM foram estocadas em geladeira e foram preparadas semanalmente.

A partir das soluções estoque, de VCM e de HVCM, foram preparadas soluções para a construção das curvas de calibração na faixa de 0,001 à 0,01 mol L⁻¹, através de diluições de volumes adequados das soluções estoque utilizando solução tampão HAc/Ac⁻, água-etanol 50 % v/v, pH 3,5 (3.2.3.5).

3.2.3.9 Solução de acetato de cobre(II) 0,06 mol L⁻¹: 600 mg de acetato de cobre(II) monohidratado (Cu(CH₃COO)₂.H₂O) foram dissolvidos em 25

mL de solução tampão HAc/Ac⁻ (pH 4,5) (3.2.3.4) em um balão volumétrico de 50,0 mL, sendo o volume completado até a marca do balão com etanol absoluto.

3.2.3.10 Solução de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹: 85 mL de ácido clorídrico concentrado (37,2 %) foram diluídos com água para um volume final de 1000 mL em balão volumétrico.

3.2.3.11 Solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹: esta solução foi obtida pela diluição apropriada da solução 1,0 mol L⁻¹.

3.2.3.12 Solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹: 4 g de NaOH anidro foram dissolvidos com água num béquer de 100 mL. Esta solução foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 1000 mL, sendo o volume completado com água até a marca e homogeneizado.

3.2.4 Preparo de amostras contendo excipientes

Misturou-se 1,0000 g de vancomicina (VCM; HVCM) independentemente com 1,0000 g de um dos quatro excipientes estudados (amido, celulose, lactose e sílica). A mistura foi feita em pequenas porções, num almofariz, triturando e homogeneizando sistemática e cuidadosamente com um pistilo.

O mesmo procedimento foi realizado para o preparo das amostras de vancomicina base e de cloridrato de vancomicina, totalizando 8 amostras.

3.3 Procedimento Experimental

3.3.1 Análise Elementar

Foi realizada no laboratório de análises C,H,N do Instituto de Química da Unicamp, usando o aparelho Perkin Elmer Elemental Analyzer modelo PE 2400.

3.3.2 Espectrofotometria na região do Infravermelho (FT-IR)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos no laboratório de infravermelho do Instituto de Química da Unicamp.

Foram preparadas pastilhas de KBr da seguinte forma: uma porção de 10,0 mg de VCM (e de HVCM) foi misturada e homogeneizada com 90,0 mg de brometo de potássio; em seguida foi prensada para formar uma pastilha; foram obtidos os espectros de infravermelho médio (entre 400 - 4000 cm^{-1}) da VCM e da HVCM.

3.3.3 Análises de DSC e TGA

Foram realizadas no laboratório de análises térmicas do Instituto de Química da Unicamp, usando os equipamentos TA Instruments modelo DSC 2910 Differential Scanning Calorimetry e TA Instruments modelo 2050 Thermogravimetric Analyzer.

A análise de DSC foi conduzida com um ciclo de variação de temperatura, iniciando com aumento de temperatura constante da amostra em 10 °C / minuto, até atingir o valor de 250 °C, em seguida permanecendo nesta temperatura durante 5 minutos, para finalmente a amostra ser resfriada até 25° também a uma razão de 10 °C / minuto.

A análise de TGA consistiu no aumento constante da temperatura da amostra até 800 °C, sob atmosfera inerte de nitrogênio, e no decorrer do aumento da temperatura monitorou-se a variação na massa da amostra.

3.3.4 Desenvolvimento do Método Espectrofotométrico

No desenvolvimento do método proposto nesta dissertação estudou-se o fármaco sob duas formas: a vancomicina denominada vancomicina base (denominada neste trabalho como VCM) e o cloridrato de vancomicina (denominado neste trabalho como HVCM). As duas espécies foram estudadas tanto na sua forma pura como em mistura com um de quatro possíveis

excipientes, dentre os mais usados na indústria farmacêutica (amido, celulose, lactose, sílica), simulando formulações farmacêuticas.

O método proposto baseou-se na reação da vancomicina com íons cobre(II), inicialmente descrita por Chabenat et al. (1983), onde se forma uma espécie de cor lilás com máximo de absorção em 555 nm.

Foram realizados estudos dos parâmetros que influenciam esta reação, como o contra-íon do sal de cobre(II), o solvente, o pH, a proporção molar entre soluções de vancomicina e do íon cobre(II) e a temperatura.

Como método de comparação empregou-se o cromatográfico (HPLC) segundo Lunn (2000), que emprega o mesmo tipo de coluna cromatográfica, detector e fase móvel no método descrito nas Farmacopéias Americana e da Britânica (British Pharmacopeia, 2002, USP, 2005), porém a análise é realizada em modo isocrático, enquanto que nas Farmacopéias o utiliza-se o modo de gradiente.

O método de cromatografia líquida de alta eficiência utilizou de coluna cromatográfica Nova Pak C18, com 250 mm de diâmetro, diâmetro interno de 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 μm , fase móvel composta de acetonitrila:triethylamina:tampão triethylamina em água, pH 3,2, ajustado com ácido fosfórico, na proporção 7:1:92 v/v, vazão de 1 mL min⁻¹ e detector na região do ultravioleta, com comprimento de onda ajustado em 284 nm.

Os resultados de recuperação dos métodos foram comparados através do teste *t* pareado de Student (Eckschlager, 1972; Calcutt e Boddy, 1983).

3.3.5 Construção da Curva Analítica

A partir das soluções estoque de VCM (3.2.3.7) e de HVCM (3.2.3.8) foram preparadas soluções de calibração na faixa de 0,001 a 0,01 mol L⁻¹, através de diluições adequadas das soluções estoque com uso da solução tampão HAc/Ac⁻, água-etanol 50 % v/v, pH 3,5 (3.2.3.5).

Foram preparadas 5 soluções de VCM e 8 de HVCM para a construção das curvas analíticas.

Misturou-se 1,5 mL de cada solução de calibração de VCM ou de HVCM, com 1,5 mL da solução de acetato de cobre(II) $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ (3.2.3.9), resultando na formação de um complexo lilás solúvel, com máximo de absorção no comprimento de onda de 555 nm.

Foram realizadas 3 leituras de absorbância de cada uma das soluções (retirando e recolocando a cubeta no espectrofotômetro), utilizando a média dessas leituras para a construção da curva.

3.3.6 Tratamento das amostras de VCM e HVCM

3.3.6.1 Amostras puras de VCM e HVCM

O procedimento foi o mesmo tanto para VCM como para HVCM. Pesou-se 75,0 mg ($\pm 0,1$ mg) do analito, que foi inicialmente dissolvido em 5,0 mL de mistura tampão aquosa HAc/Ac⁻ pH=3,5 (3.2.3.3) sendo, então, transferido para um balão volumétrico de 10,0 mL. Em seguida, adicionou-se 0,096 mL de ácido clorídrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (3.2.3.10), e completou-se o volume do balão com 5 mL de etanol absoluto, quase até o menisco. Após a homogeneização, ajustou-se o menisco da mistura com solução tampão HAc/Ac⁻ pH 3,5-etanol 50 % v/v (3.2.3.5).

3.3.6.2 Amostras sintéticas

O procedimento de extração das amostras contendo vancomicina e cloridrato de vancomicina foi desenvolvido no laboratório, baseado na solubilidade do excipiente frente aos solventes utilizados.

Dentre os excipientes estudados, a lactose foi o único que se mostrou total e facilmente solúvel nos solventes empregados. O procedimento seguido para esse tipo de amostra foi a pesagem de 150,0 mg ($\pm 0,1$ mg) do analito. A dissolução foi realizada da mesma forma que nas amostras puras de VCM e HVCM, como descrito na seção acima.

No caso dos excipientes parcialmente solúveis (amido, celulose e sílica), pesou-se 150,0 mg ($\pm 0,1$ mg) de alíquota da amostra preparada em tubo de ensaio com tampa, e dissolveu-se com 1,0 mL da solução tampão aquosa HAc/Ac⁻ pH=3,5 (3.2.3.3). Em seguida adicionou-se 0,096 mL de ácido clorídrico 1,0 mol L⁻¹ (3.2.3.10). Realizou-se, então, agitação manual vigorosa do conteúdo do tubo por 1 minuto. Após esta agitação, o tubo foi levado à centrífuga. Foi feita centrifugação à 3000 rotações por minuto (rpm) durante 3 minutos. A seguir, retirou-se o sobrenadante do tubo de ensaio, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e transferiu-se para um balão volumétrico de 10,0 mL. A mesma alíquota foi submetida à mais duas etapas de extração (totalizando três etapas), sem a adição do ácido clorídrico. Os sobrenadantes resultantes dessas extrações foram misturados no mesmo balão. Em seguida, adicionou-se 2,0 mL de solução tampão aquosa HAc/Ac⁻ pH=3,5 (3.2.3.3), e completou-se o volume do balão até o menisco com etanol absoluto, homogeneizando, a seguir.

A figura 3 esquematiza o processo de extração de VCM e HVCM das amostras contendo excipientes.

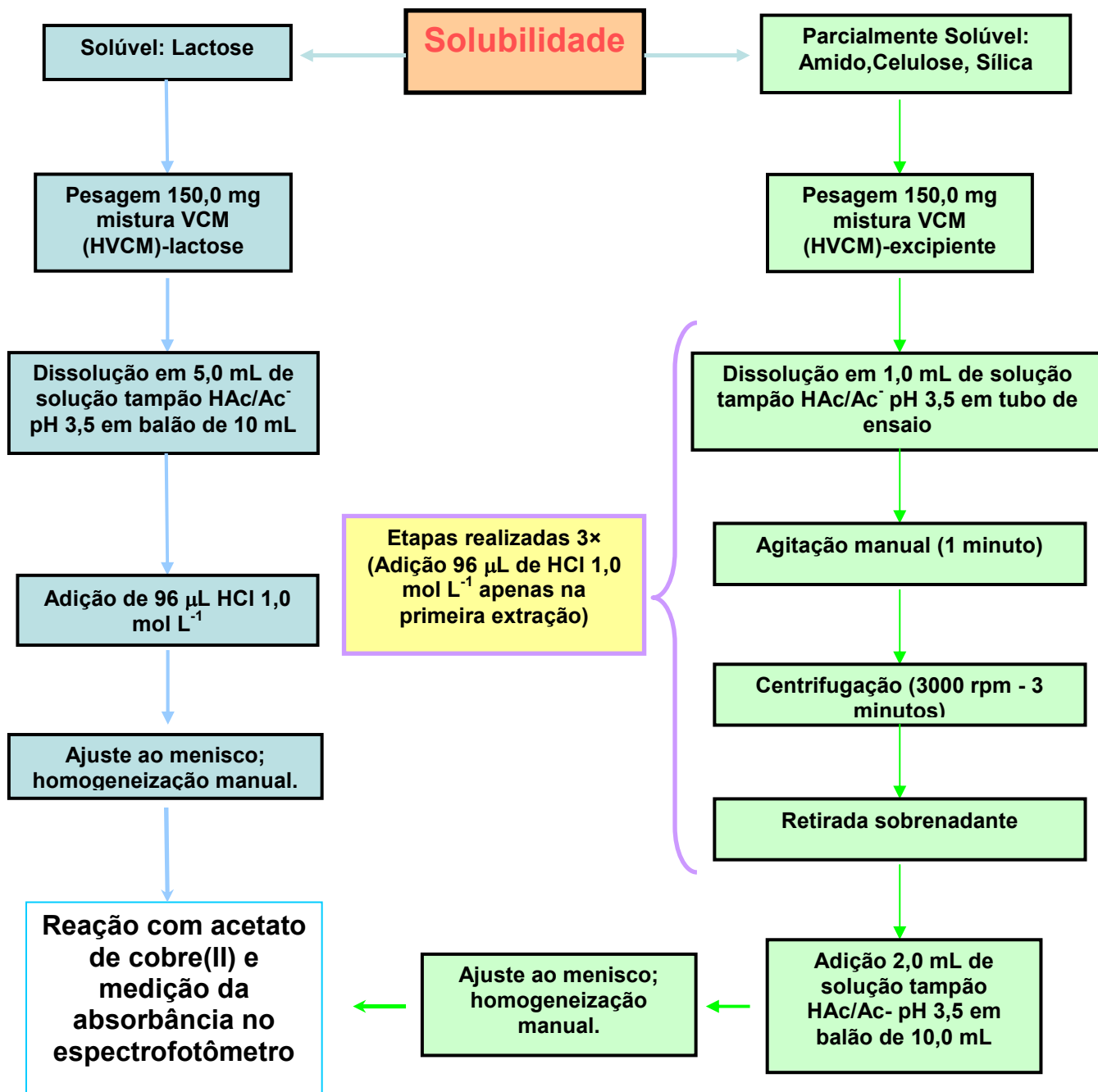


Figura 3. Esquema do processo de extração de VCM e HVCM em amostras contendo excipientes.

3.3.6.3 Reação com solução de cobre(II)

Misturou-se 1,50 mL das soluções obtidas com as amostras que originalmente continham excipientes após as extrações com 1,50 mL da solução de acetato de cobre(II) $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ (3.2.3.9), da mesma forma que no caso da preparação das soluções de calibração de VCM e HVCM para construção da curva analítica.

Logo após, foi feita a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 555 nm, para quantificar a sua concentração.

3.3.7 Estudos de especificidade (Shabir et al, 2003).

Pesou-se 75,0 mg de VCM e HVCM para estudos de especificidade através de dissolução com as soluções: 10 mL de solução básica ($\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 10 mL de solução ácida ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), 10 mL de solução oxidante (peróxido de oxigênio 3 % v/v) e 10 mL de água. Após a dissolução, estas misturas foram aquecidas a 80°C durante 30 minutos.

Depois deste tratamento, adicionou-se, à 1,5 mL de cada uma destas misturas, 1,5 mL de acetato de cobre(II) $0,06 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida observou-se visualmente para confirmar ou não a formação do complexo.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Introdução

Grande parte dos trabalhos envolvendo caracterização e/ou avaliação de propriedades da molécula de vancomicina têm sido realizado através de técnicas de difração de raios-X (Sheldrick et al., 1978; Schäfer et al., 1996; McPhail et al., 1998) e ressonância magnética nuclear (Pearce e Williams, 1995; Pearce et al., 1995; Gerhard et al. 1992). Recentemente, interações não covalentes da vancomicina com ligantes que simulam o receptor da parede celular também foram investigadas através da espectrometria de massas (Heck e Jorgensen, 2004).

4.2 Análise elementar

A composição percentual teórica da vancomicina base ($M=1449,3 \text{ g mol}^{-1}$) para os elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio é: C 54,7 %; H 5,2 %; N 8,7 % (The Merck Index, 1996).

A composição percentual teórica do cloridrato de vancomicina ($M=1485,8 \text{ g mol}^{-1}$) para os elementos carbono, hidrogênio e nitrogênio é: C 53,4 %; H 5,2 %; N 8,5 %.

Na tabela 1 estão os resultados obtidos experimentalmente, para a composição percentual em carbono, hidrogênio e nitrogênio, com as amostras de VCM (vancomicina base) e HVCM (cloridrato de vancomicina) utilizadas neste trabalho, onde são comparadas com os valores teóricos.

Os resultados das porcentagens apresentados nesta tabela foram corrigidos em função do grau de pureza dos compostos (94,7 % para VCM e 96,8 % para o HVCM) e do teor de água presente (17,0 % para VCM e 2,2 % para HVCM), conforme apresentado no laudo que acompanhou as amostras de VCM e HVCM.

Tabela 1. Porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio encontrados nos fármacos HVCM e VCM utilizados neste trabalho e seus valores teóricos.

Elemento	VCM % literatura	VCM % experimental	HVCM % teórica	HVCM % experimental
C	54,7	55,0	53,4	54,6
N	8,7	8,6	8,5	8,7
H	5,2	5,0	5,2	5,4

Os resultados obtidos são próximos ao valor teórico, tanto para VCM como para HVCM. Portanto, os fármacos usados foram considerados adequados para o prosseguimento dos trabalhos.

4.3 DSC e TGA

As análises de calorimetria diferencial por varredura (DSC) de VCM e de HVCM estão apresentadas nas figuras 4 e 5, respectivamente.

Nos dois gráficos de DSC aparece um sinal endotérmico centrado em 121,34 °C para VCM e em 154,11 °C para HVCM.

Nas análises por termogravimetria de VCM (figura 6) e HVCM (figura 7) observa-se que, no caso da VCM há significativa perda de massa (11,27%) entre aproximadamente 40 e 200 °C, que corresponde à absorção de energia observada no caso da análise por DSC. No caso da HVCM observa-se fato semelhante. Na análise termogravimétrica verifica-se perda de 5,79% de massa entre 40 e 200 °C, aproximadamente, o que corresponde à absorção de energia observada no caso da análise por DSC.

Tanto os gráficos de DSC quanto os termogramas indicam a perda de água de cristalização presente nos dois analitos, além da degradação dos compostos com o aumento da temperatura.

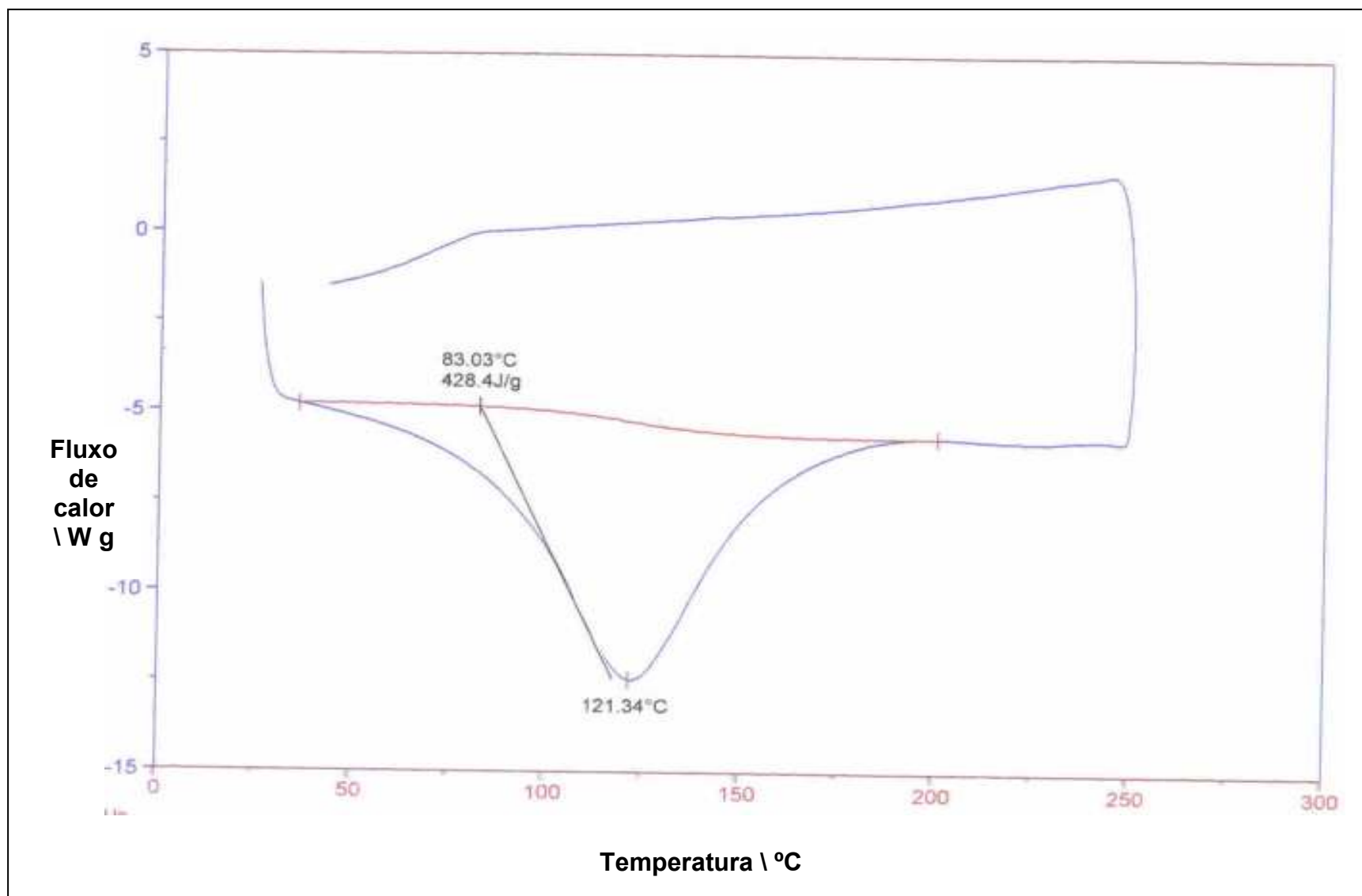


Figura 4. Gráfico de DSC da molécula de VCM

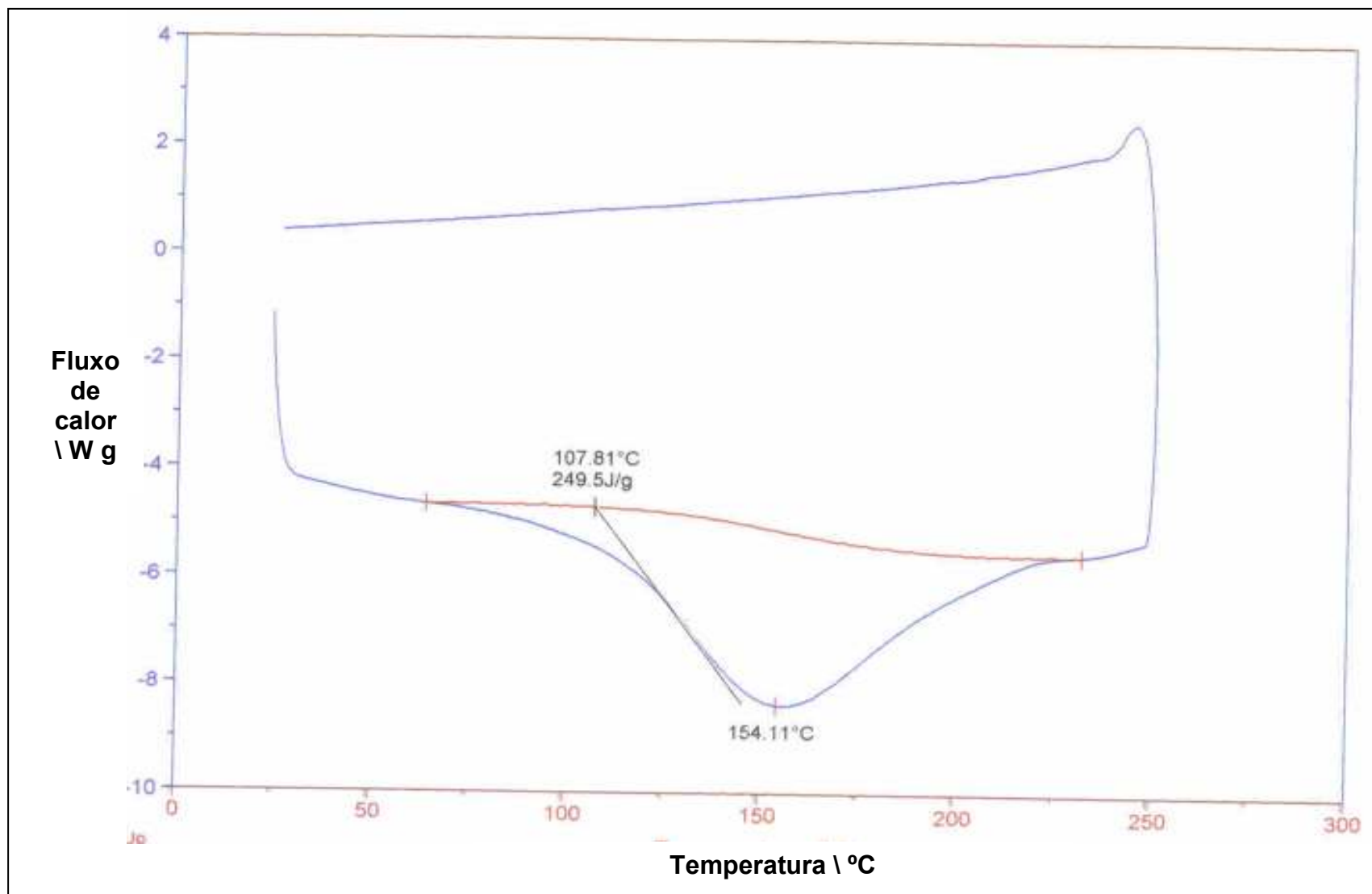


Figura 5. Gráfico de DSC da molécula de HVCN.

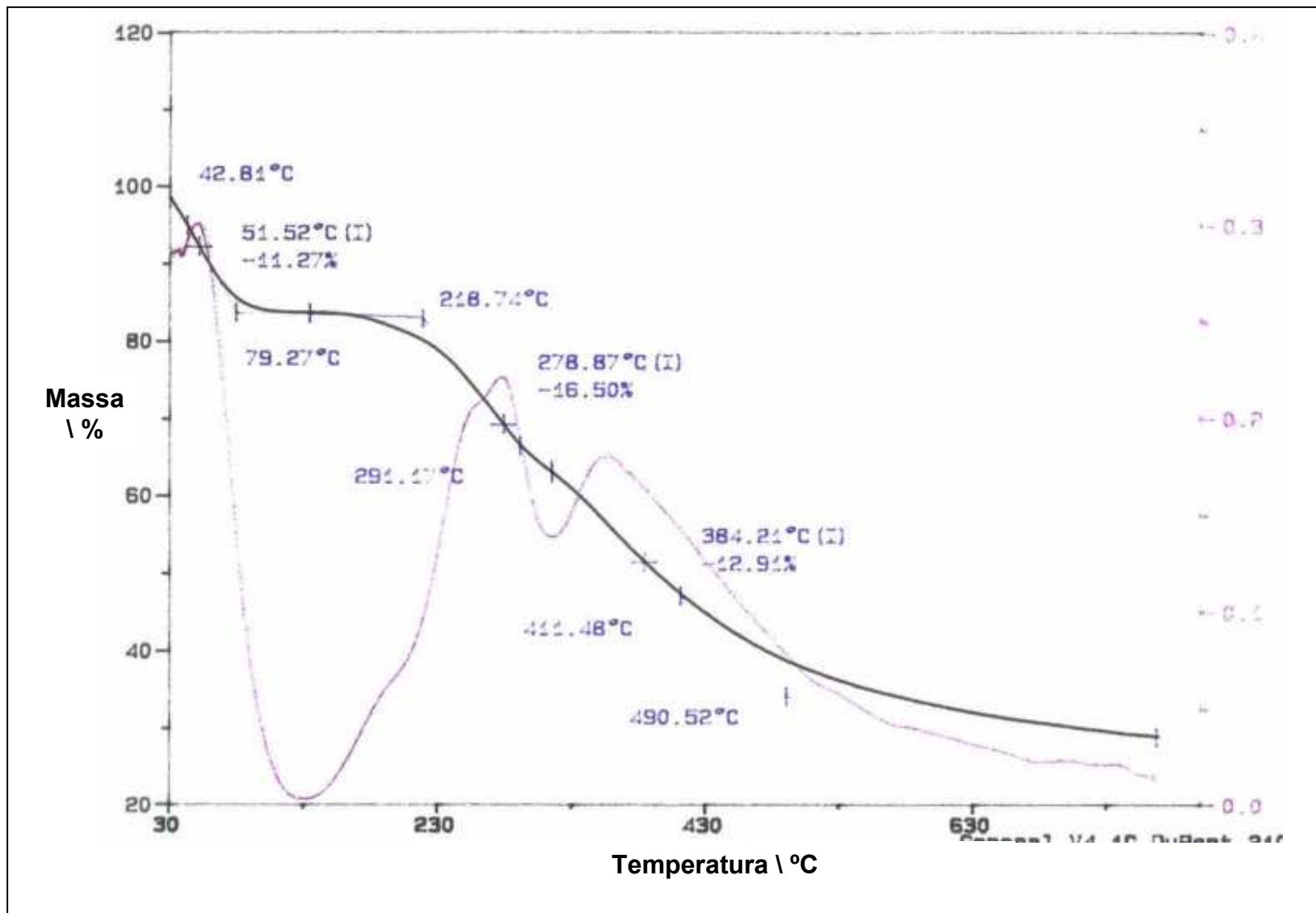


Figura 6. Termograma da molécula de VCM.

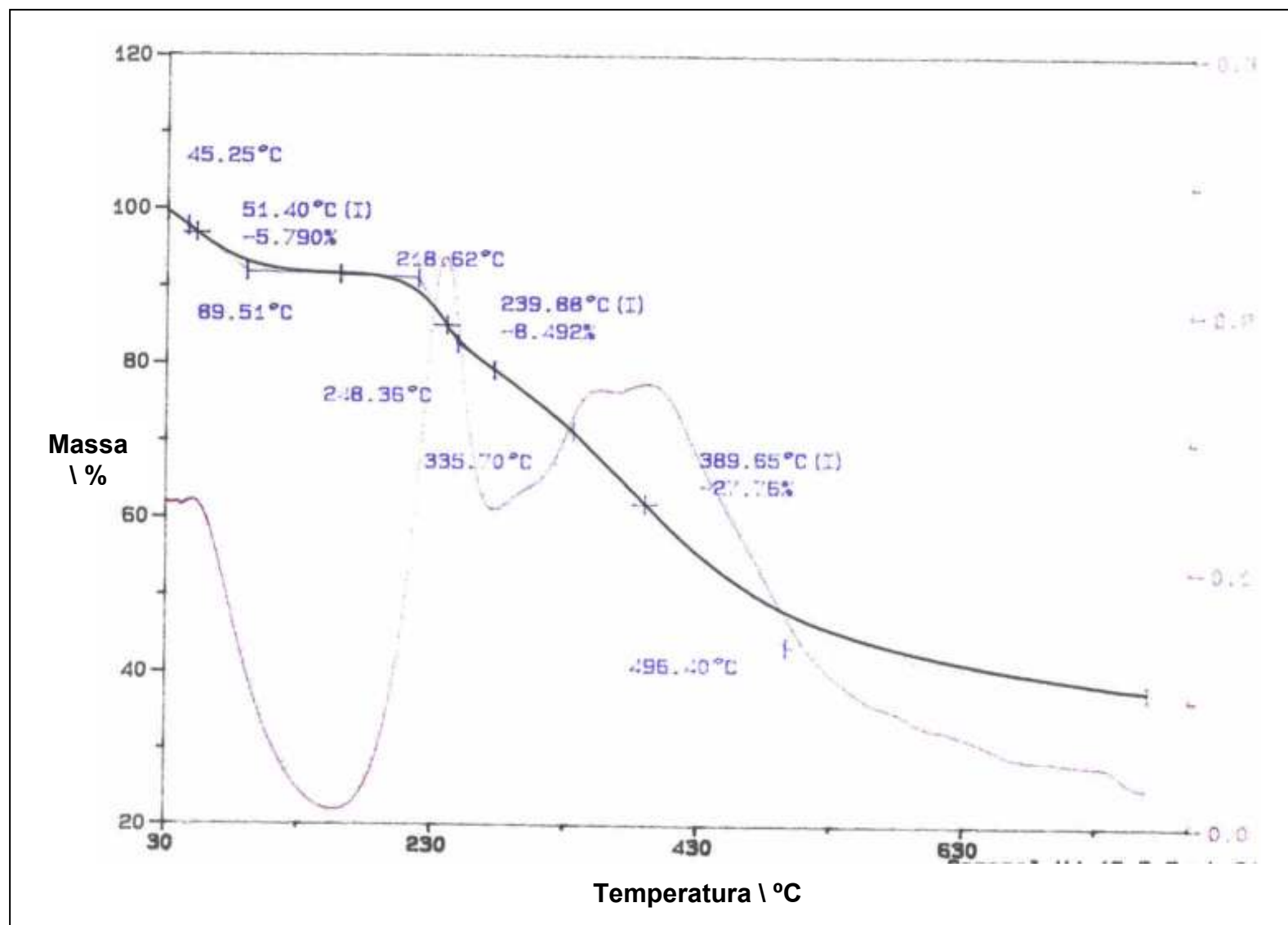


Figura 7. Termograma da molécula de HVCm.

4.4 Infravermelho (FT-IR)

Os espectros no infravermelho médio (figura 8), da vancomicina base e do cloridrato de vancomicina foram obtidos no estado sólido usando pastilhas de KBr. Tal registro foi feito, uma vez que não foram encontrados tais espectros na literatura corrente, e considerou-se o espectro de infravermelho como um indicativo para confirmação da estrutura dos analitos.

Na figura 8 podem ser vistos os espectros da VCM e da HVCM na região do infravermelho médio, entre 500 e 4000 cm^{-1} .

Os espectros dos dois compostos são similares. Contudo, apesar de diferenças na transmitância, que podem ser originárias da preparação das pastilhas, se eles forem observados com um pouco de cuidado, mesmo sem a pretensão de fazer uma detalhada atribuição de frequências, algumas diferenças aparecem. Por exemplo, na região acima de 3300 cm^{-1} as diferenças podem ser atribuídas à protonação de grupos NH_2 amídicos não substituídos no caso da HVCM. As diferenças observadas na região abaixo de 1700 cm^{-1} , podem também ser atribuídas, pelo menos em parte, à mudanças na frequência vibracional de deformação fora do plano do grupo NH_2 , no estiramento C=O e do estiramento da ligação C-N (Colthup et al. 1975).

Na região de aproximadamente 3000 - 3600 cm^{-1} , deve-se lembrar da vibração de estiramento da ligação $\text{O-H}\cdots\text{O}$ que apresenta uma banda muito larga, como aparece nos espectros obtidos.

Ao redor de 1127 cm^{-1} aparece a vibração de deformação axial assimétrica da ligação C-O-C presente em um anel de 6 membros. Entre 1520-1650 cm^{-1} , aparecem as vibrações referentes aos anéis aromáticos da molécula (Silverstein e Webster, 1998; Pavia, Lampmam e Kriz, 2001).

Para o HVCM, também se obteve espectros de uma amostra após secagem, em dessecador, com pentóxido de fósforo, com o propósito de verificar se a banda em 3500 cm^{-1} , característica de deformação da ligação $\text{O-H}\cdots\text{O}$ de água, teria sua intensidade diminuída. A secagem foi feita colocando uma porção do antibiótico, finamente pulverizado, em um vidro de relógio. Este ficou fechado dentro de um dessecador de vidro em presença de pentóxido de fósforo por 5

dias, quando foi obtido o primeiro espectro. Na seqüência, o segundo espectro foi obtido após 7 dias de secagem.

Ao observarmos com cuidado os espectros após a secagem, não aconteceu a redução da intensidade da banda de deformação da ligação O-H...O de água. Pode-se, então supor que a água presente no antibiótico seja mais do que simples umidade, fazendo parte da estrutura cristalina. Os espectros após secagem dos antibióticos estão apresentados na figura 9.

Esta evidência de água de cristalização apresentada pelos espectros de infravermelho vêm de encontro com as informações fornecidas pelos termogramas das figuras 6 e 7, onde pode se observar a perda desta água de cristalização.

Freqüências referentes à ligação C-Cl, são observadas entre $500-900\text{ cm}^{-1}$, (Schrader, 1995). Isto nos leva a pensar que o decaimento na transmitância observado abaixo de 900 cm^{-1} pode ser atribuído à presença de cloro nas moléculas de VCM e de HVCM.

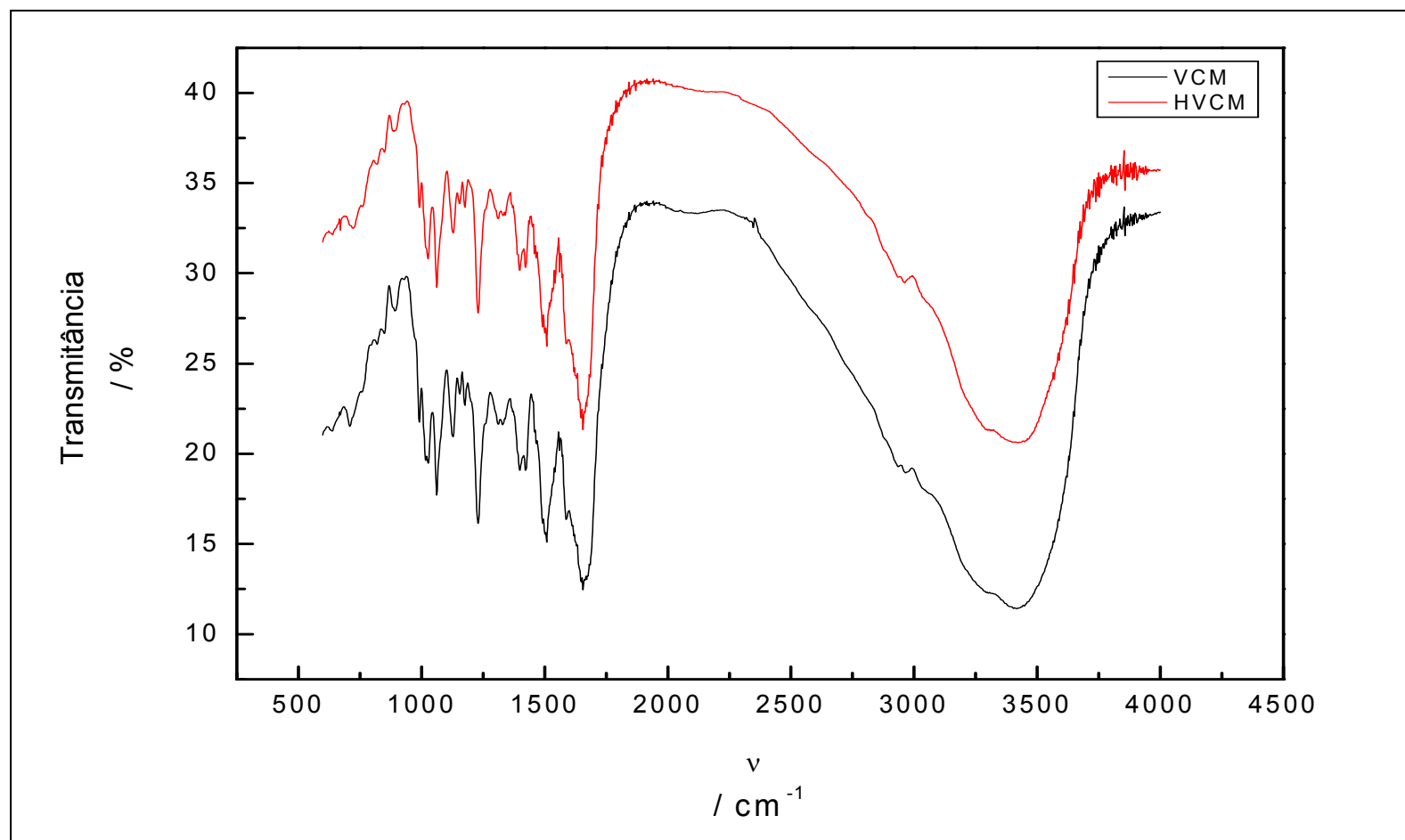


Figura 8. Espectros na região do infravermelho médio de VCM e HVCM.

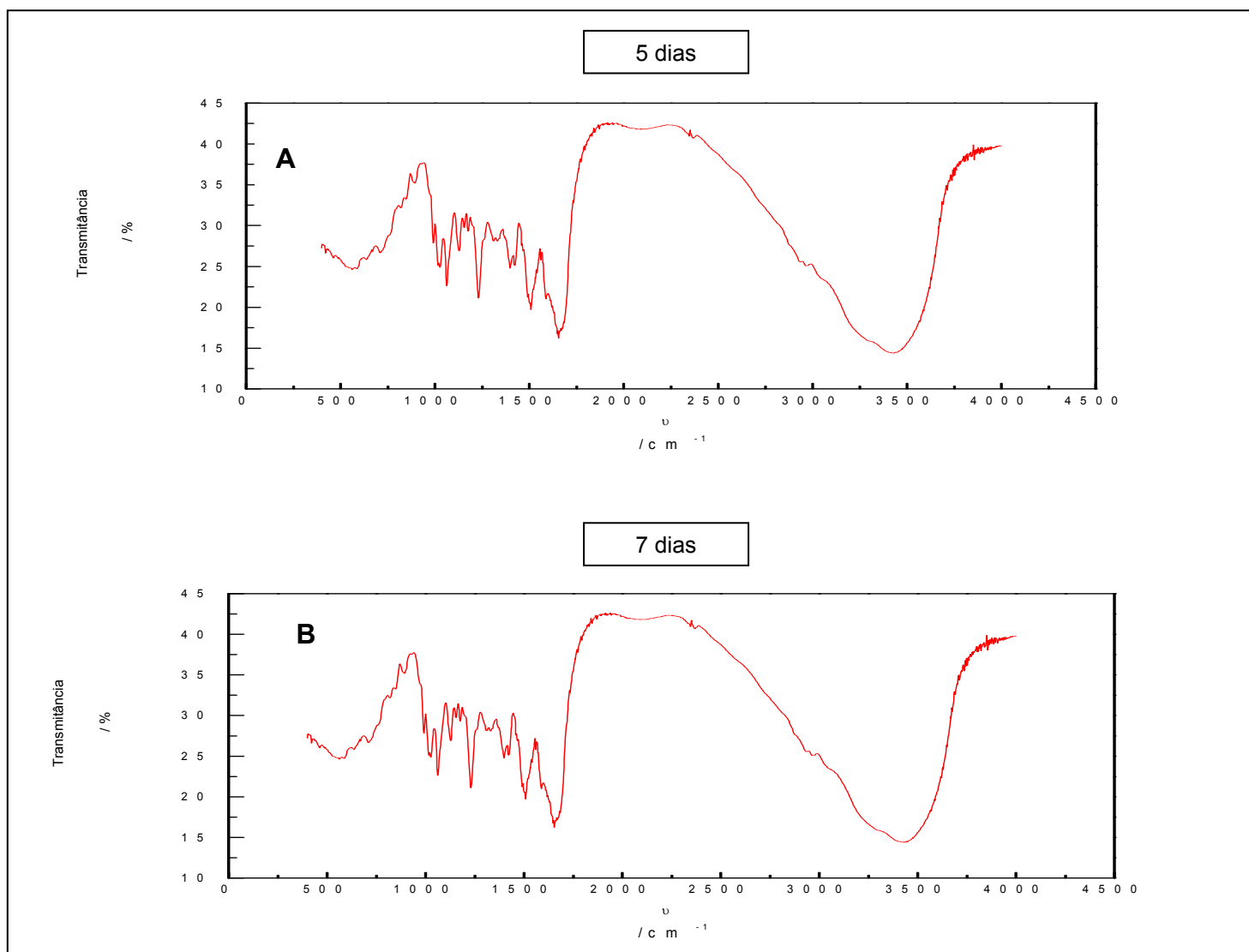


Figura 9. Espectros na região do infravermelho médio ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) de HVCm após **A)** 5 dias e **B)** 7 dias de secagem com pentóxido de fósforo.

4.5 Desenvolvimento do método

Para o desenvolvimento da técnica de quantificação utilizando o método espectrofotométrico proposto, baseado na reação entre a vancomicina e o íon cobre(II), com a formação de um complexo com coloração lilás, foram avaliados os seguintes parâmetros para otimização do procedimento: contra-íons de diferentes sais de cobre(II) para reação com o analito; solventes para dissolução do analito e do sal de cobre(II) e suas combinações; pH do meio reacional; proporção molar entre a molécula de vancomicina e o íon cobre(II); temperatura.

4.5.1 Estudo da influência dos contra-íons dos sais de cobre(II) e dos solventes

Inicialmente estudou-se qual seria o contra-íon conjugado com o cátion cobre(II) que pudesse, eventualmente, ser mais favorável na reação do íon metálico com a vancomicina. Também foram feitos estudos a respeito dos solventes, puros ou em mistura, onde a reação pudesse apresentar melhor desempenho, tendo em conta os quesitos rapidez, estabilidade, solubilidade e alta absorção molar do complexo.

Foi estudada a reação de HVCM, dissolvida em água, com diferentes soluções de sais de cobre(II) (sulfato, acetato, nitrato e cloreto), dissolvidos em água, acetonitrila ou etanol. Os resultados são mostrados nas figuras 10 a 13. O branco era constituído de solução aquosa do mesmo sal de cobre(II) usado para a reação e na mesma concentração utilizada para a reação.

Foi observado que o acetato de cobre(II), dissolvido em qualquer dos três solventes (água, etanol e acetonitrila), é o sal mais adequado para a reação, conforme mostra a figura 10. Esta observação difere do resultado apresentado no trabalho de Chabenat et al. (1983), que utilizou o cloreto de cobre(II) para complexação.

No caso da reação com acetato de cobre(II), segundo Schäfer et. al. (1996), a vancomicina apresenta uma configuração favorável à complexação com o íon cobre(II) na presença do íon acetato, pois este íon mimetiza a parte C-terminal da

parede celular da bactéria, se ligando aos dois grupos amino do esqueleto peptídico da molécula, e com a cadeia lateral $\text{NH}_2^+-\text{CH}_3$.

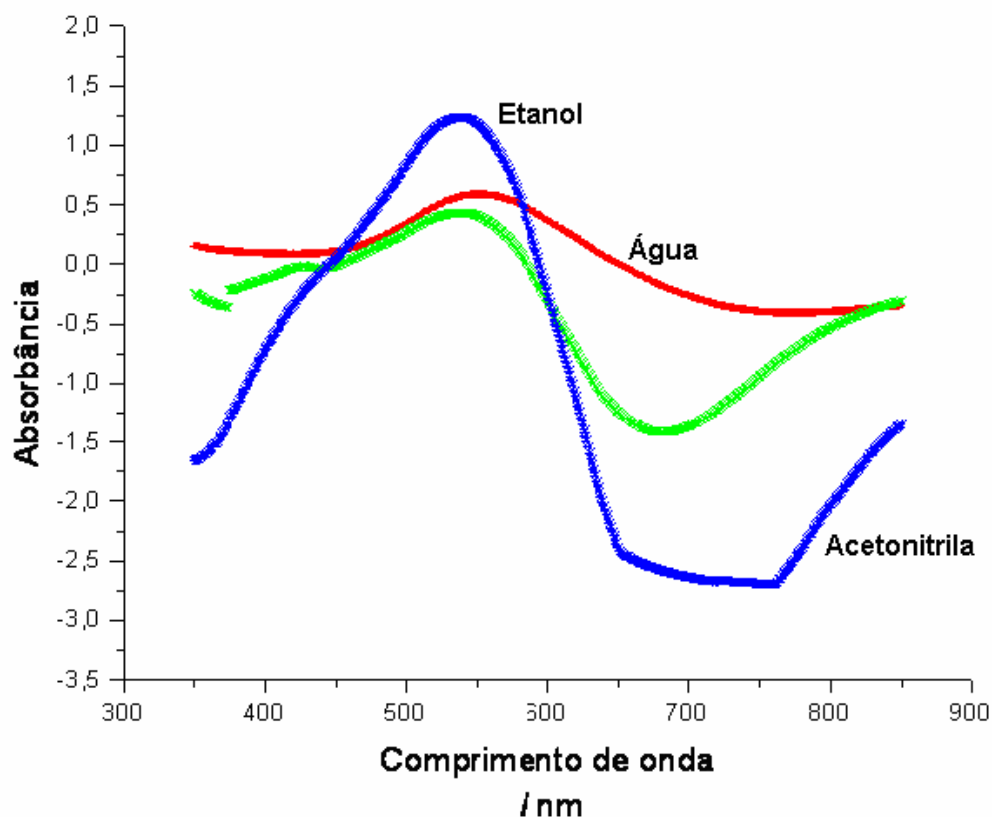


Figura 10. Espectros do produto da reação de HVCm $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) em água com acetato de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) em: água, acetonitrila e etanol. Branco: mistura de solução acetato de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) com água (1,5 mL) no solvente adequado com água para obter uma solução 50 % v/v.

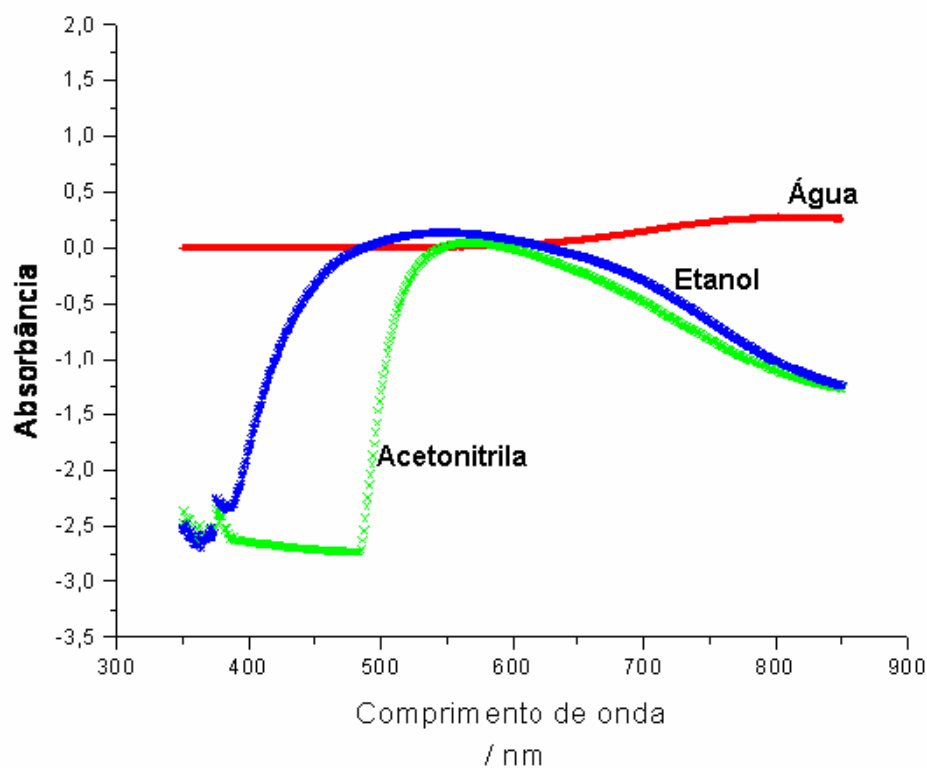


Figura 11. Espectros do produto da reação de HVCM $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ em água (1,5 mL) com cloreto de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) em: água, acetonitrila e etanol. Branco: mistura de solução contendo cloreto de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ no solvente adequado com água de modo a obter uma solução 50 % v/v.

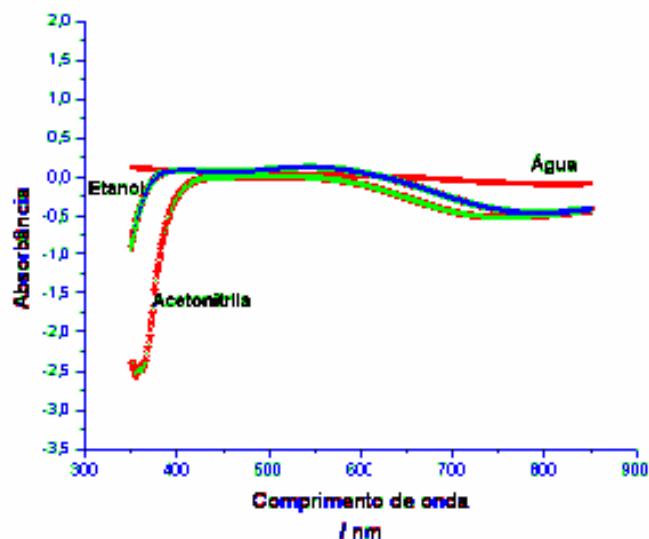


Figura 12. Espectros do produto da reação de HVCM $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ em água (1,5 mL) com nitrato de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) em: água, acetonitrila e etanol. Branco: mistura de solução contendo solução de nitrato de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ no solvente adequado com água de modo a obter uma solução 50 % v/v.

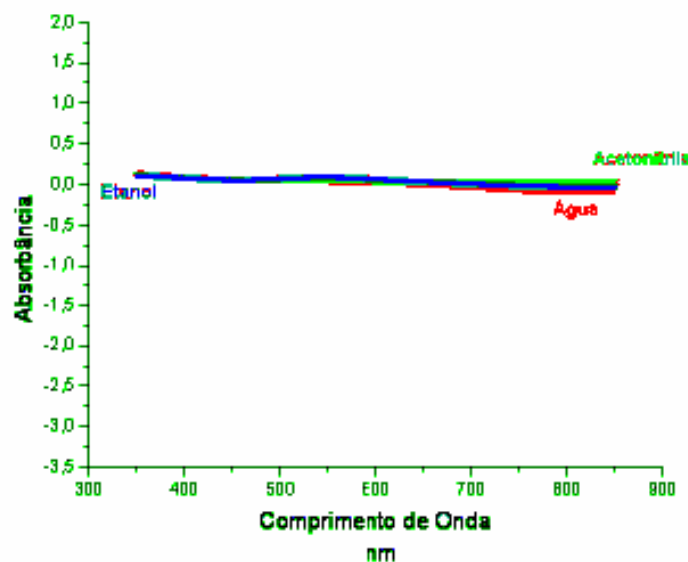


Figura 13. Espectros do produto da reação de HVCM $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ em água (1,5 mL) com sulfato de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ (1,5 mL) em: água, acetonitrila e etanol. Branco: mistura de solução contendo solução de sulfato de cobre(II) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ no solvente adequado com água de modo a obter uma solução 50 % v/v.

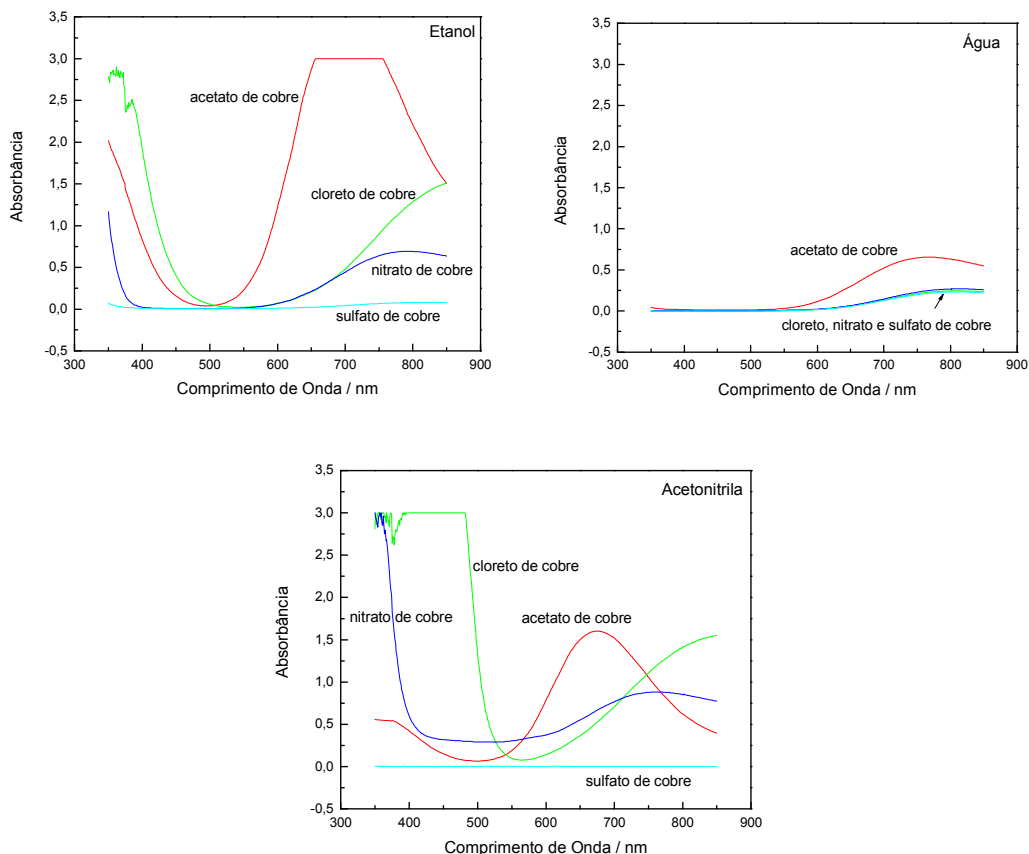


Figura 14. Espectros na região do ultravioleta-visível, de soluções de acetato, cloreto, nitrato e sulfato de cobre(II) em etanol, em água e em acetonitrila. A concentração dos sais é igual a $0,02 \text{ mol L}^{-1}$.

Na figura 14 são mostrados os espectros dos sais testados de cobre(II), que foram dissolvidos em água, etanol e acetonitrila, e que foram empregados como brancos nos estudos cujos resultados estão resumidos nas figuras 10, 11, 12 e 13.

Outros solventes testados foram o pentanol e o álcool isopropílico, quanto à solubilidade dos sais de acetato de cobre(II) e cloreto de cobre(II). Os resultados mostraram que estes solventes não dissolvem estes sais. A escolha destes dois sais foi devida, no caso do acetato, por causa dos melhores resultados de absorbância, e do cloreto pelos resultados apresentados por Chabenat et al. (1983). Os resultados obtidos de solubilidade (observação visual) dos sais de cobre(II), do pH da mistura e da reação com HVCM, em todos os solventes empregados, estão apresentados na tabela 2.

Segundo Nair et al. (1996) a interação entre o íon cobre(II) e a vancomicina em meio aquoso acontece com a formação de 4 ligações entre o íon e a molécula e uma ligação entre cobre(II) e uma molécula de água, fazendo com que o cobre tenha um número de coordenação 5, conforme mostrado na figura 15.

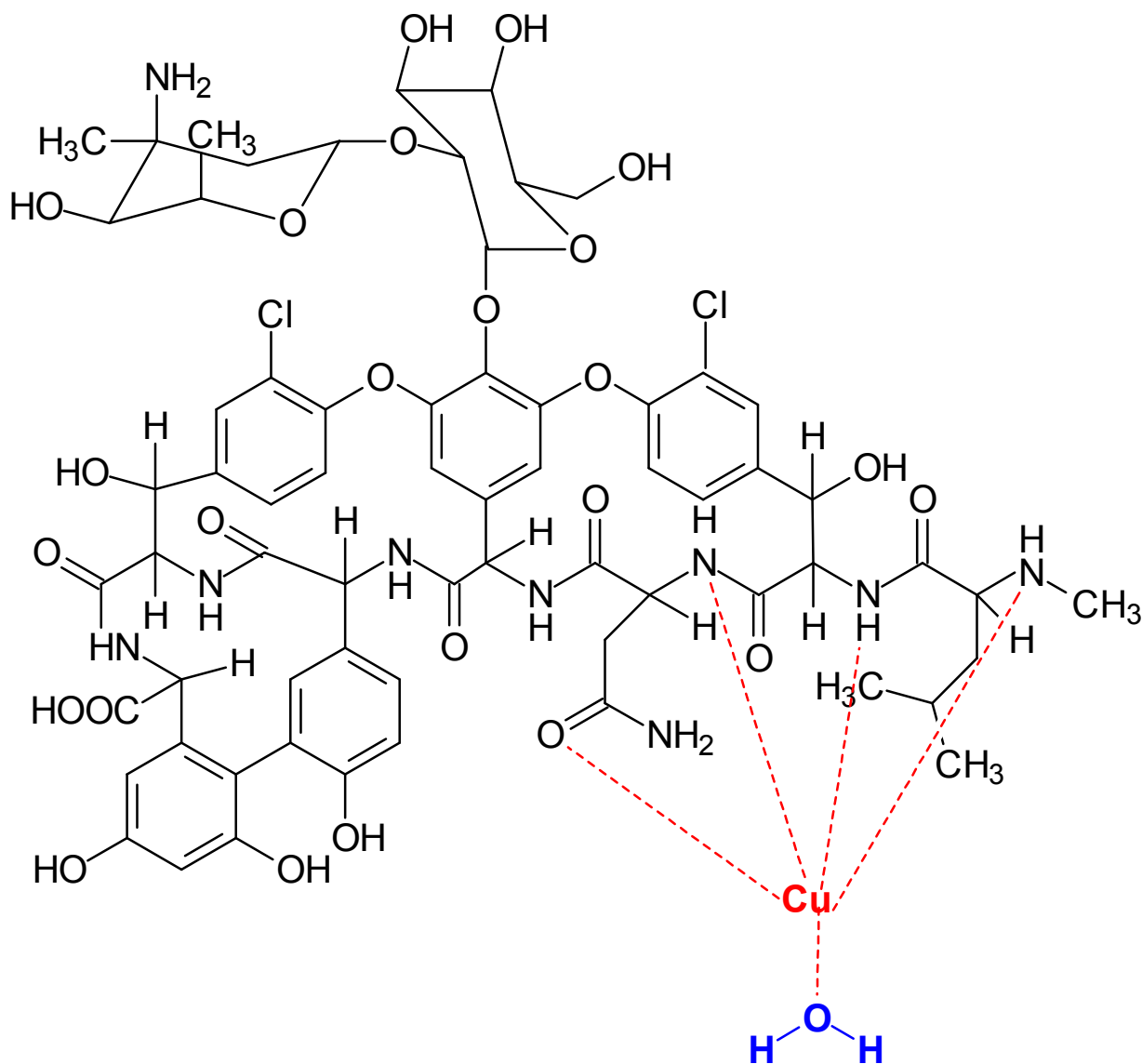


Figura 15. Representação das ligações entre o íon cobre(II) com a molécula de vancomicina em meio aquoso (Nair et al., 1996).

Tabela 2. Resultados de solubilidade, pH e reação com HVCM em água dos sais de cobre (II).

Acetato de Cobre(II)	Solubilidade	Água	Etanol	Acetonitrila	Pentanol	Álcool Isopropílico
		Solúvel	Solúvel	Parcialmente Solúvel	Insolúvel	Insolúvel
	Cor da solução	Azul claro	Verde escuro	Verde claro	Incolor	Incolor
	pH	7	7	8	7	7
	Reação com HVCM _(aq) *	+	+	+	-	-
Cloreto de Cobre(II)	Solubilidade	Água	Etanol	Acetonitrila	Pentanol	Álcool Isopropílico
		Solúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel
	Cor da solução	Incolor	Verde amarelado	Amarelo escuro	Verde amarelado	Verde amarelado
	pH	4	6	4	5	5
	Reação com HVCM _(aq) *	±	±	±	-	-
Nitrato de Cobre(II)	Solubilidade	Água	Etanol	Acetonitrila	Pentanol	Álcool Isopropílico
		Solúvel	Solúvel	Solúvel	-	-
	Cor da solução	Incolor	Azul	Azul	-	-
	pH	5	6	5	-	-
	Reação com HVCM _(aq) *	±	±	±	-	-
Sulfato de Cobre(II)	Solubilidade	Água	Etanol	Acetonitrila	Pentanol	Álcool Isopropílico
		Solúvel	Parcialmente solúvel	Insolúvel	-	-
	Cor da solução	Incolor	Azul	Incolor	-	-
	pH	4	7	7	-	-
	Reação com HVCM _(aq) *	±	±	±	-	-

* **Legenda:** + , reação ocorre; ± , reação ocorre, mas o meio reacional fica opaco; – , não há formação de complexo.

4.5.2 Proporção molar

A proporção entre HVCM e íons cobre(II), segundo Chabenat et al. (1983) é de 1:1, empregando cloreto de cobre(II) e HVCM em soluções aquosas. Esta mesma proporção foi observada neste trabalho na reação entre HVCM aquoso e acetato de cobre(II) preparado em etanol anidro.

O estudo da proporção foi realizado empregando acetato de cobre(II) em excesso em relação ao HVCM, sendo as leituras de absorbância feitas em 760 nm, comprimento de onda que corresponde ao $\lambda_{\max}$ do acetato de cobre(II). A partir dos resultados de absorbância, no meio reacional, para soluções contendo apenas acetato de cobre(II), obteve-se o valor do coeficiente de absortividade molar do acetato de cobre(II) ($\varepsilon = 36,12 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$). Assim, a partir daí, foi possível determinar a concentração de acetato de cobre(II) que não reagiu nas soluções que continham HVCM ou VCM. Os resultados indicaram uma relação molar de 1:1 vancomicina:cobre(II). Entretanto, optou-se, para o método, pelo uso de soluções onde a relação entre as concentrações das soluções de VCM (HVCM) e acetato de cobre(II) fique na proporção de 1:3 ou mais, visando garantir a complexação total do analito. O uso de etanol no preparo das soluções também foi favorável, pois resultou em um aumento no valor de absorbância.

A figura 16 A apresenta os espectros de absorção do complexo, em solução água/etanol, na região do visível, onde pode se observar a variação da absorbância em relação à concentração de HVCM, tendo sido mantida constante a concentração de acetato de cobre(II). O $\lambda_{\max}$ do complexo formado se localiza em 555 nm.

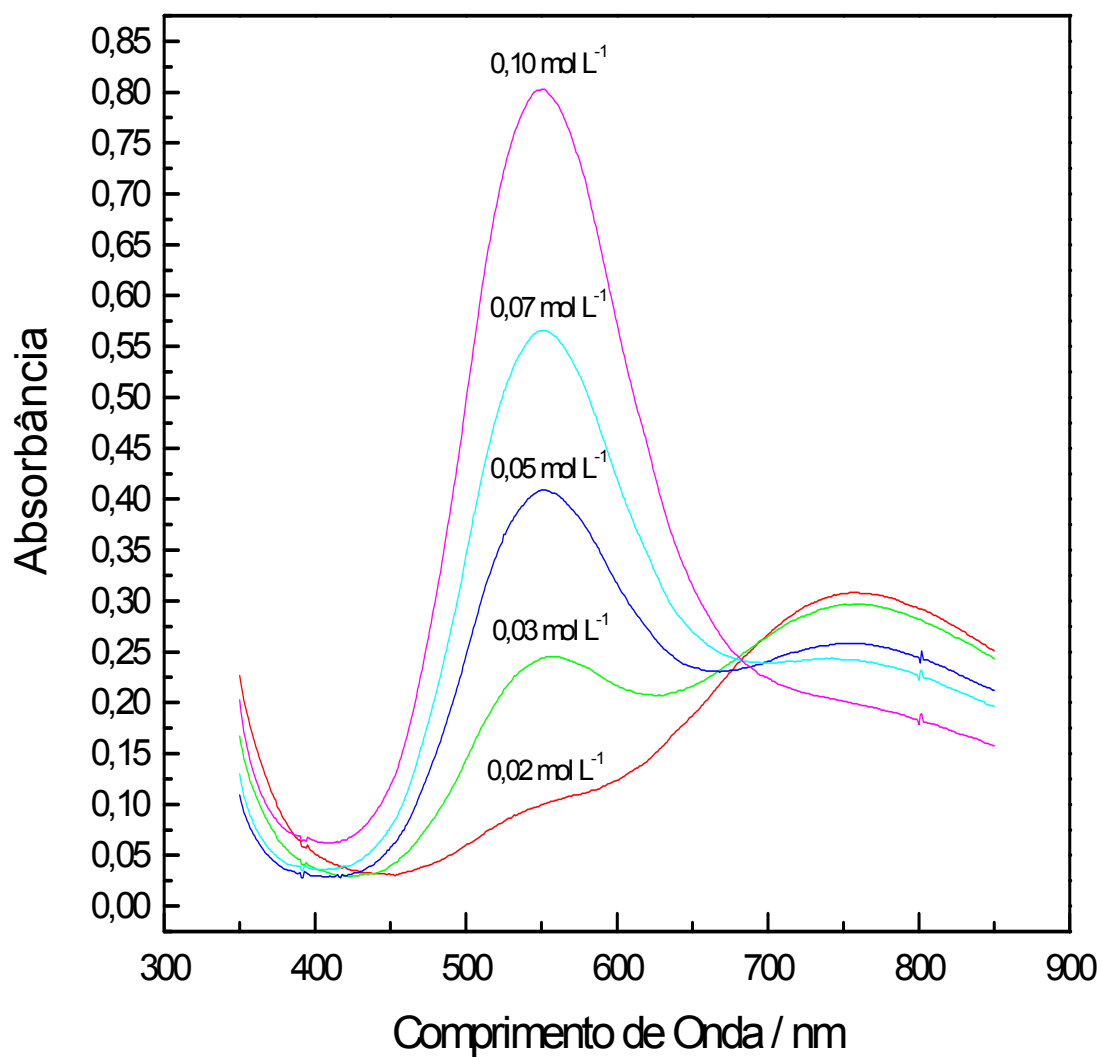


Figura 16. Espectros do complexo formado na reação entre acetato de cobre (II) 0,02 mol L⁻¹ em etanol (1,5 mL) com HVCM em água (1,5 mL) em diferentes concentrações. (Branco: mistura de 1,5 mL de etanol com 1,5 mL de água).

4.5.3 Temperatura

Durante o desenvolvimento do método, foi constatado que o complexo precipitava em água, dificultando a realização de medidas espectrofotométricas. Com a adição de etanol observou-se que o intervalo de tempo para que ocorresse a precipitação aumentava. Observou-se, também, que o intervalo de tempo, a partir da mistura dos reagentes, para o início da precipitação, não é constante. Em outras palavras, o complexo ora precipitava imediatamente após a mistura das soluções reagentes, ora levava alguns minutos e até horas.

Um dos fatores que causava essa precipitação era a mistura muito rápida da solução de VCM (HVCM) com a solução de acetato de cobre(II). Essa mistura feita de maneira abrupta resultava em rápida formação de precipitado lilás. Assim, a mistura entre as soluções contendo o analito e a solução de acetato de cobre foi realizada com adição cuidadosa, gota a gota, da solução de acetato de cobre(II) às soluções de VCM (HVCM), com o que obteve intervalos maiores de tempo antes do início da precipitação.

Para tentar aumentar o intervalo de tempo de precipitação do complexo, foram feitos alguns estudos do efeito da temperatura das soluções reagentes na estabilidade da solução do complexo.

Informações de literatura mostram que a VCM, em soluções oftálmicas, pode ser estocada em baixas temperaturas, inclusive em temperaturas abaixo de zero, por até 3 meses sem alterações em suas propriedades físico-químicas (Sautou-Miranda et al., 2002). Assim, para fazer os estudos de influência de temperatura optou-se por manter a solução de HVCM em 5 °C, adicionando-se a solução de cobre em temperaturas variadas, até 35 °C.

O termo “tempo de estabilidade” foi definido como o período que se inicia na mistura dos reagentes formando o complexo de coloração lilás, até o momento em que inicia a precipitação. O gráfico da figura 17 apresenta, nas abscissas, as temperaturas nas quais a solução de acetato de cobre (II) foi termostatizada, em banho, e o intervalo de tempo (nas ordenadas) em que o complexo permaneceu solúvel; considerando-se a reação entre solução aquo-etanólica de acetato de cobre(II) 0,02 mol L⁻¹ e solução aquosa de HVCM 0,02 mol L⁻¹. A temperatura da

solução de HVCM foi mantida em todos os casos em 5 °C. Volumes iguais das duas soluções foram misturados, o que permitiu estimar que a temperatura do meio reacional é a media aritmética das duas temperaturas. Como pode ser observado (figura 17 e tabela 3), o controle de temperatura não significou aumento de estabilidade do complexo, tenha este controle sido feito com temperaturas acima ou abaixo da ambiente. Assim, optou-se por manter as soluções reagentes à temperatura ambiente.

Tabela 3. Intervalo de tempo necessário para o início da precipitação do complexo formado em função da temperatura da solução de acetato de cobre(II) 0,02 mol L⁻¹ em água-etanol 50%, reagindo com solução de HVCM 0,01 mol L⁻¹ em água.

Temperatura solução acetato de cobre(II) / °C	Tempo ^a / minutos
5	14,6 ± 4,3
15	15,8 ± 7,0
20	9,4 ± 0,3
25	10,4 ± 0,6
30	9,9 ± 1,5
35	8,9 ± 2,2

^a intervalo de tempo após o qual o complexo precipita; número de determinações, n= 3.

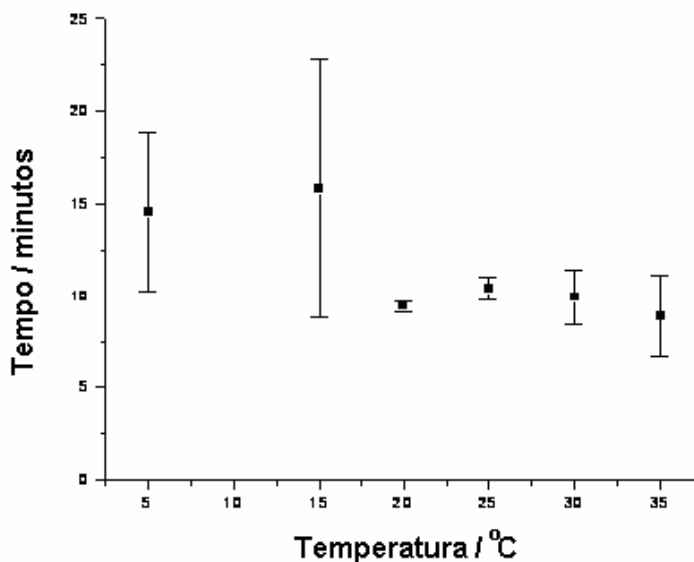


Figura 17. Tempo para o início da precipitação do complexo HVCM- Cu^{2+} , em relação à temperatura da solução de acetato de cobre(II). Solução de HVCM mantida em 5 °C.

4.5.4 pH

Segundo Antipas et al. (2000) o pH do meio é um fator de forte influência sobre a estrutura da vancomicina, limitando inclusive sua vida de prateleira, devido a deaminação do resíduo de asparagina com formação de “zwiterion” e diminuição de sua solubilidade em água. Outro aspecto importante é que enquanto o HVCM é solúvel em água destilada, o ajuste de pH é necessário para dissolver a VCM (Inman, 1987)

Com base nessas informações, foram iniciados estudos de pH com as soluções envolvidas na formação do complexo. Na primeira parte, estudou-se dois valores de pH para as soluções de acetato de cobre(II): 3,5 e 4,5. O objetivo foi verificar em qual pH era obtida a maior absorbância, portanto maior formação do complexo ao reagir com VCM. Foi adicionado etanol a essas soluções, nesses dois valores de pH, de modo a obter soluções preparadas sempre em tampão

HAc/Ac⁻ e em etanol, na proporção de 50% em função do volume (mistura tampão-etanol 50 % v/v).

Foram usadas, ainda, soluções de diferentes concentrações, de $1,0 \times 10^{-3}$ à $7,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, de VCM, preparadas em solução tampão HAc/Ac⁻ (pH 3,5), para reagirem frente à soluções de acetato de cobre(II) $0,060 \text{ mol L}^{-1}$, preparadas em dois pH diferentes, ou seja, pH 3,5 e pH 4,5, como mostrado na tabela 4.

Tabela 4. Variação dos valores de absorbância, em 555 nm, da reação de soluções de acetato de cobre(II) $0,060 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes valores de pH (pH 3,5 e pH 4,5), com soluções de VCM com pH 3,5.

VCM / mol L^{-1}	Absorbância (acetato de cobre(II) pH 3,5 ^a)	Absorbância (acetato de cobre(II) pH 4,5 ^b)
0,0010	0,184	0,210
0,0030	0,306	0,330
0,0050	0,425	0,450
0,0070	0,550	0,577

^a Solução de acetato de cobre preparada em mistura de etanol com solução tampão HAc/Ac⁻ (pH ajustado em 3,5), na proporção de 50 % v/v.

^b Solução de acetato de cobre preparada em mistura de etanol com solução tampão HAc/Ac⁻ (pH ajustado em 4,5), na proporção de 50 % v/v.

Os valores mostram que quando o acetato de cobre é usado em pH 4,5, a absorbância final obtida é maior, ou seja, forma-se mais complexo ou, simplesmente, há um aumento no valor da absorvidade molar do complexo.

Estudou-se também a adição de etanol, em várias concentrações, às soluções de VCM e de HVCM, para verificar qual a influência deste solvente na reação.

A concentração de etanol foi variada de 25 à 50 % na mistura final entre as duas soluções reagentes. Para a reação foi usada solução $0,060 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de cobre(II) em solução tampão HAc/Ac⁻, água-etanol 50 % v/v, pH 4,5. Os resultados estão na tabela 5.

Tabela 5. Valores de absorvância obtidos da reação de soluções de HVCM e VCM $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ com diferentes teores de etanol, com acetato de cobre(II) $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão HAc/Ac⁻, água-etanol 50 % v/v, pH 4,5 .

[HVCM] / mol L^{-1}	% sol. Tampão HAc/Ac ⁻ pH 3,5 / v/v	% Etanol v/v na mistura	Aparência da solução de HVCM	Absorvância
0,020	100	25	Transparente	1,066
0,020	90	30	Transparente	1,237
0,020	80	35	Transparente	1,334
0,020	70	40	Transparente	1,407
0,020	60	45	Transparente	1,449
0,020	50	50	Transparente	1,561
[VCM] / mol L^{-1}	% sol. Tampão HAc/Ac ⁻ pH 3,5 / v/v	% Etanol / v/v na mistura	Aparência da solução de VCM	Absorvância
0,020	100	25	Transparente	0,937
0,020	90	30	Transparente	1,137
0,020	80	35	Transparente	1,260
0,020	70	40	Transparente	1,237
0,020	60	45	Transparente	1,322
0,020	50	50	Transparente	1,378

Os resultados indicam que é interessante o uso do etanol como solvente em conjunto com água, por resultar em aumento na absorvância do complexo em solução. Limitou-se a porcentagem do álcool em 50 % v/v pois acima desta concentração precipitam tanto o antibiótico como o acetato de cobre.

4.5.5 Estabilidade da solução do complexo

Após o estudo envolvendo diferentes solventes para a solubilização tanto de VCM, HVCM e acetato de cobre(II), procurou-se observar a estabilidade do complexo formado. A figura 18 apresenta os resultados obtidos no monitoramento dos valores de absorvância, em 555 nm, do complexo formado na reação entre HVCM $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ (em solução tampão-etanol pH 3,5) e acetato de cobre(II) (concentrações de $0,020$ a $0,060 \text{ mol L}^{-1}$) em solução tampão HAc/Ac⁻, água-etanol 50 % v/v, pH 4,5 durante 20 minutos.

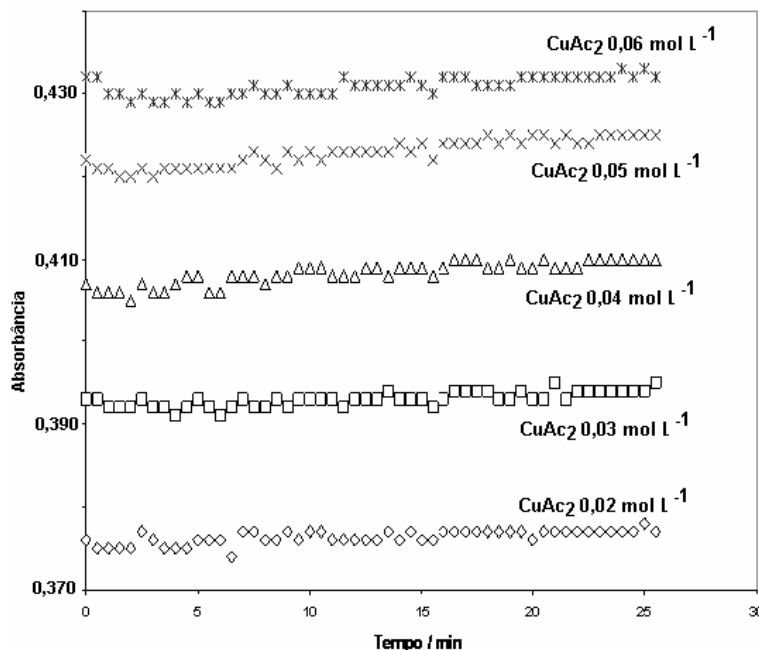


Figura 18. Absorbância de reações de HVCM com soluções de acetato de cobre(II) em diferentes concentrações, em função do tempo. Medidas feitas a cada 30 segundos, em $\lambda = 555 \text{ nm}$. Branco: 1,5 mL solução tampão HAc/Ac⁻, água-etanol 50 % v/v, pH 3,5 com 1,5 mL solução tampão HAc/Ac⁻, água-etanol 50 % v/v, pH 4,5.

Os experimentos, cujos resultados podem ser visualizados na figura 18, confirmam o período de solubilidade do complexo formado nas condições indicadas. Nota-se facilmente que é possível obter medidas de absorbância com fins quantitativos por, pelo menos, 20 minutos, após a mistura das soluções, tempo mais do que suficiente para fins operacionais.

Outro estudo realizado foi a adição de NaCl em soluções de HVCM, a fim de verificar se há influência no aumento da estabilidade da solução do complexo pela presença do íon cloreto, retardando-se a sua precipitação. Foi feito, também, em separado o estudo da influência do HCl para verificar a contribuição isolada do Na⁺.

Os gráficos obtidos em função do tempo estão representados na figura 19. Observa-se que nos primeiros 25 minutos a absorbância permaneceu constante para a solução contendo HCl e até 40 minutos para a solução contendo NaCl,

aumentando lentamente após estes limites, o que indica início de turvação das soluções, portanto, início da precipitação.

Nota-se facilmente que nos dois casos houve um aumento da absorbância do complexo ao serem misturadas as soluções reagentes (solução final transparente), ao se comparar as absorbâncias iniciais neste caso ($\approx 0,470$), com a absorbância inicial ($\approx 0,430$) que pode ser lida na figura 18 (CuAc_2). Isto sugere influência dos íons cloreto, uma vez que ocorre tanto na solução onde foi adicionado HCl como na que foi adicionado NaCl.

Examinando, porém, mais detalhadamente a figura 19, verificamos que a absorbância inicial é maior no caso do uso de HCl em comparação com NaCl.

É interessante notar, também, pela figura 19 que o aumento da concentração de sódio na solução (lembrar do NaAc), pela adição de NaCl, contribui para retardar a precipitação do complexo. Para visualizar este efeito basta comparar as respectivas curvas relativas à adição de HCl e de NaCl.

O efeito do sódio, na estabilização da solução do complexo, embora maior do que o do HCl, não contribui significativamente em facilitar a o procedimento analítico. Os, cerca de, 25 minutos obtidos pela adição de HCl já são suficientes, adicionando-se à isto um pequeno aumento adicional na absorbância da solução inicial do complexo.

Nestes estudos de adição de HCl e de NaCl, adicionou-se quantidades de soluções de HCl e NaCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de modo a obter excesso de cloreto em relação ao antibiótico. Trabalhou-se com a proporção molar HVCM: Cl^- 1:2.

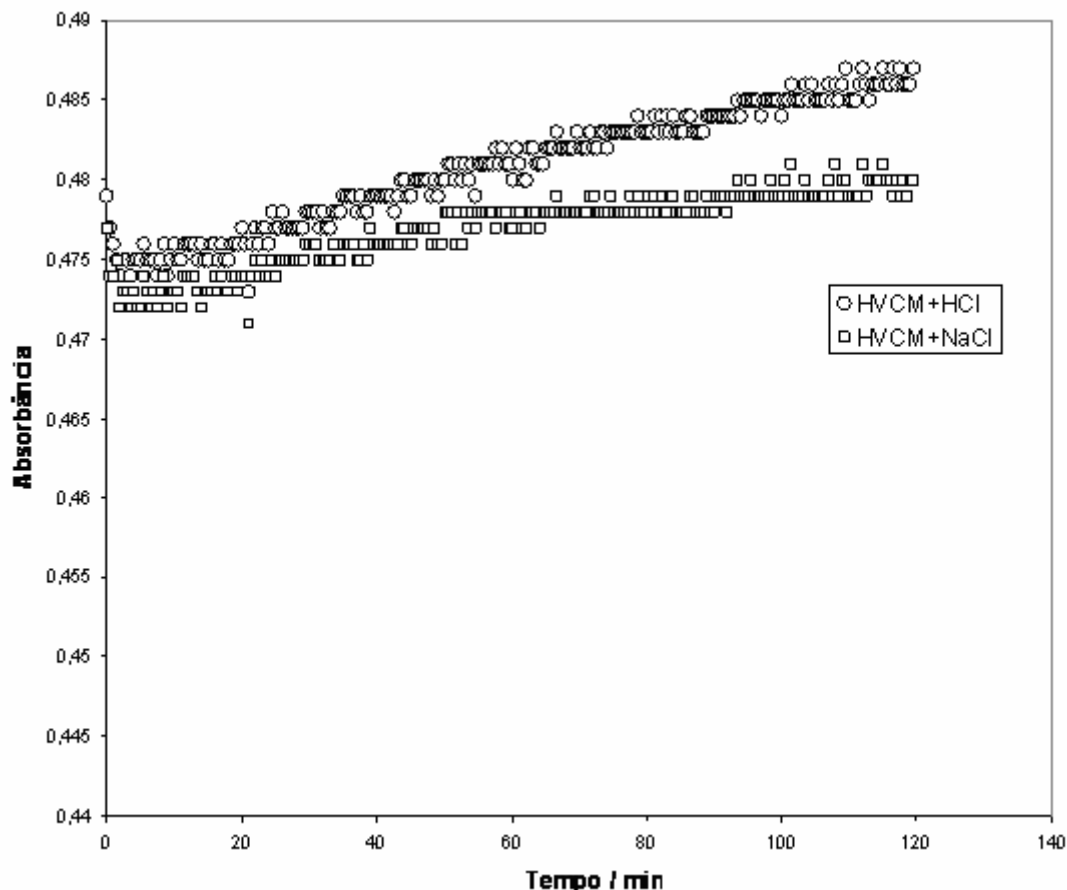


Figura 19. Variação da absorbância da solução de reação entre HVCM $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de cobre(II) $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{max}} = 555 \text{ nm}$). HVCM em solução tampão HAC/ Ac^- pH 3,5, água-etanol 50 % v/v, com adição de HCl ou NaCl e acetato de cobre(II) em solução tampão HAC/ Ac^- , água-etanol 50 % v/v, pH 4,5. Leitura da absorbância a cada 30 segundos.

Assim, pelos resultados até aqui mostrados considerou-se como condições ideais para a formação do complexo estável em solução, o uso de solução tampão, com pH em 3,5, misturado a um volume igual de etanol, para a solubilização da VCM e da HVCM, enquanto que para o preparo da solução de acetato de cobre(II), o uso de solução tampão, com pH em 4,5 mostrou-se mais adequando, também em conjunto com etanol em volumes iguais. A proporção mínima entre as soluções de VCM (HVCM) e acetato de cobre(II) ficou definida em 1:3 em temperatura ambiente (25° C).

4.5.6 Curvas Analíticas e Figuras de Mérito

As curvas analíticas de VCM e HVCM estão apresentadas na figura 20. Para as duas espécies as curvas foram construídas compreendendo uma faixa de concentração entre $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Feita a regressão linear de mínimos quadrados obteve-se:

$$\text{para VCM, } y = 0,11 + 75,0 C \text{ (Eq.1), } r=0,99996$$

$$\text{para HVCM, } y = 0,11 + 72,8 C \text{ (Eq.2), } r=0,99999$$

Os limites de quantificação (LOQ) e de detecção (LOD) calculados para VCM foram $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente; para HVCM o resultado de LOQ foi $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e de LOD $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Os cálculos de LOQ e LOD foram baseados na relação entre a estimativa de desvio padrão de 3 medidas do branco (SD), que foi calculado em 0,001 e o coeficiente angular da equação da reta **a**. Para o LOQ, considerou-se a equação $\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}/a$ (Eq.3) e para LOD $= 3,3 \times \text{SD}/a$ (Eq.4) (ICH, 1997).

Como as equações de VCM e HVCM apresentaram resultados semelhantes tanto nos valores de coeficientes, limite de detecção, limite de quantificação e absorbância, considerou-se uma única curva analítica, compreendendo os resultados para VCM e para HVCM:

$$y = 0,12 + 75,5 C \text{ (Eq.5), } r= 0,9997$$

Usando esta equação, o limite de detecção (LOD) é $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e o limite de quantificação (LOQ) é $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

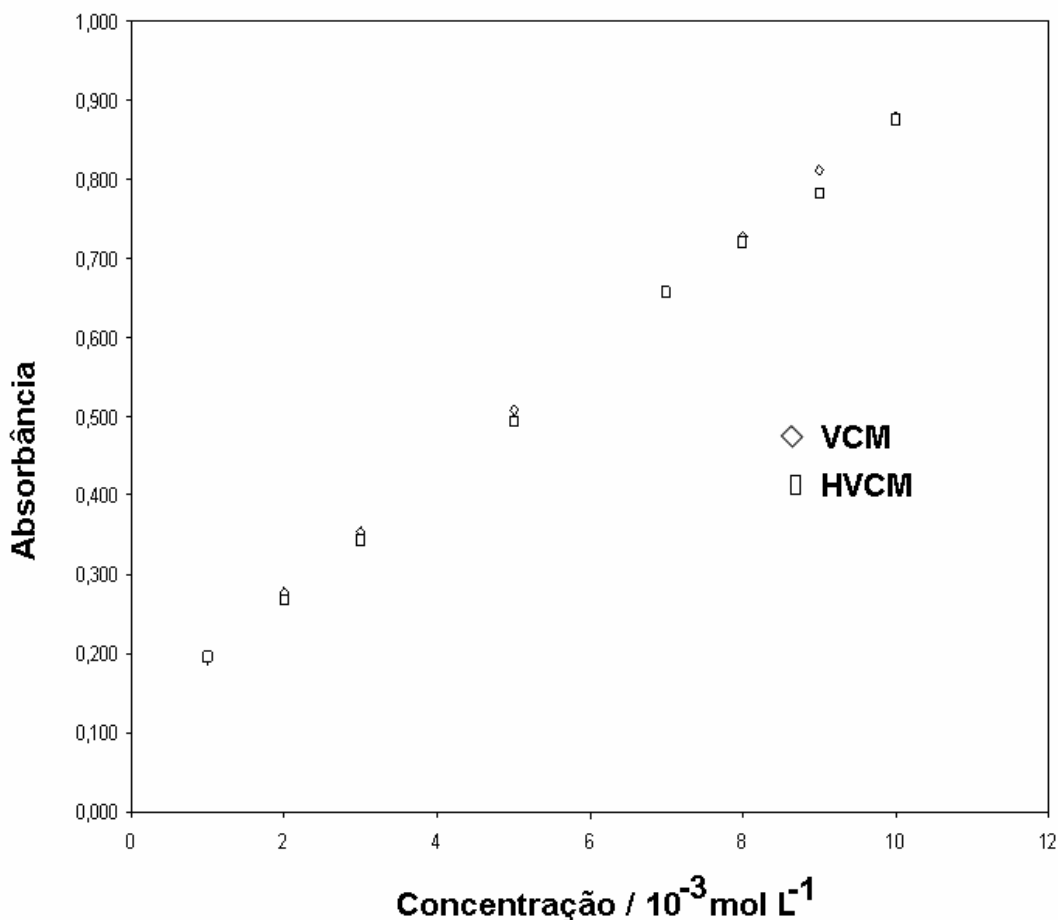


Figura 20. Curva analítica com soluções de HVCM e VCM preparadas em solução tampão HAc/Ac⁻, água-etanol 50 % v/v, pH 3,5. Reação com acetato de cobre(II) 0,06 mol L⁻¹ em solução tampão HAc/Ac⁻, água-etanol 50 % v/v, pH 4,5, $\lambda = 555$ nm, branco 1,5 mL de solução tampão HAc/Ac⁻, água-etanol 50 % v/v, pH 3,5 misturado com 1,5 mL de solução tampão HAc/Ac⁻, água-etanol 50 % v/v, pH 4,5 $y = 0,12 + 75,5 C$; Limite de detecção (LOD): $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; Limite de quantificação (LOQ): $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; Coeficiente de correlação: 0,9997.

Embora a utilização de VCM e HVCM seja hospitalar, existem pouquíssimas formulações que apresentam excipientes e não foram encontradas no mercado. Assim, foi avaliado o desempenho do método para a análise de VCM e HVCM frente a excipientes comumente usados na indústria farmacêutica, como amido, celulose, lactose e sílica. Para esta avaliação foram comparados os resultados de recuperação obtidos pelo método espectrofotométrico, aqui proposto, na presença individual de cada um dos quatro excipientes, com os valores de recuperação obtidos pelo método de cromatografia líquida de alta

eficiência (HPLC). A comparação foi feita usando o teste estatístico pareado *t* de Student. Para a comparação das precisões dos métodos foi usado o teste *F* (Eckschlager, 1972; Calcutt e Boddy, 1983).

O procedimento de extração de VCM e HVCM, tanto para as amostras destinadas para análise espectrofotométrica quanto para análise por cromatografia líquida, foi o mesmo descrito na seção 3.3.6.2, com concentração esperada dos analitos de $4,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para as amostras de HVCM e $4,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para as amostras de VCM. Deve-se lembrar que, por um lado, as alíquotas introduzidas no HPLC, não foram submetidas à reação com acetato de cobre(II) para a formação de complexo, mas, por outro, foram diluídas para uma concentração final de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, de modo a ajustar o sinal à escala no detector do cromatógrafo utilizado.

Os resultados de recuperação obtidos para VCM e HVCM com método proposto e no método de referência, bem como os resultados do teste *t* e *F*, estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Valores de recuperação de VCM e HVCM, em porcentagem, na presença de diferentes excipientes, pelo método proposto e pelo método de referência.

	Método Proposto %	HPLC %		
Excipiente	HVCM	HVCM	<i>t</i>	<i>F</i>
Amido	99,2 ± 0,6	99,8 ± 2,3	0,4	15
Celulose	103,7 ± 0,2	98,0 ± 1,3	6,1	42
Lactose	98,7 ± 0,2	93,7 ± 1,8	3,9	81
Sílica	100,4 ± 1,3	109,2 ± 3,8	3,1	6,1
Média*	100,4 ± 0,6	100,2 ± 3,4	0,1	32
	VCM	VCM		
Amido	99,2 ± 1,0	87,7 ± 1,2	9,6	1,0
Celulose	99,3 ± 1,2	90,6 ± 0,7	8,7	2,9
Lactose	103,4 ± 0,3	89,4 ± 0,8	23,2	7,1
Sílica	99,7 ± 0,5	90,6 ± 0,7	15,0	2,0
Média*	100,5 ± 0,8	89,6 ± 1,3	14,6	2,6

* n = Média das 12 medidas (3 de cada excipiente). Valores teóricos de t de Student para número de injeções (n), $n_1 = n_2 = 3$, com grau de liberdade $\nu = (n_1 + n_2 - 2) = 4$, $t = 2,9$ (intervalo de confiança $\alpha = 0,05$) e 4,6 ($\alpha = 0,01$). Para $n_1 = n_2 = 12$, $\nu = (n_1 + n_2 - 2) = 22$, $t = 2,1$ ($\alpha = 0,05$) e 2,8 ($\alpha = 0,01$). Valores teóricos de F para número de injeções (n), $n_1 = n_2 = 3$, com grau de liberdade ν ($\nu_1 = \nu_2$) = 2, $F = 19,0$ (intervalo de confiança $\alpha = 0,05$) e 99,0 ($\alpha = 0,01$). Para $n_1 = n_2 = 12$, ν ($\nu_1 = \nu_2$) = 11, $F = 2,9$ ($\alpha = 0,05$) e 4,4 ($\alpha = 0,01$).

Analisando a média dos resultados como um todo, não especificando os excipientes, observa-se que os resultados dos testes t e F indicam que para HVCM os dois métodos comparados são estatisticamente equivalentes em um nível de significância de 95 %. No caso da VCM, os resultados de t calculado

estão acima do valor teórico, considerando os dois níveis de significância, 95% e 99%.

Comparando isoladamente cada excipiente, para HVCM o resultado do teste t , em um nível de significância de 95 %, a amostra contendo amido é a única que apresenta valor abaixo do teórico. Em um nível de significância de 99 %, todas as amostras, exceto a que tem como excipiente celulose, apresentam valores menores que o valor teórico. Para o teste F, com $\alpha = 0,95$, o resultado obtido com amostra de sílica apresenta resultado equivalente para os dois métodos. Considerando $\alpha = 0,99$, todos os resultados ficam abaixo do valor limite.

Nas amostras contendo VCM, todos os resultados do teste t se encontram acima do limite teórico. Um dos motivos para essa não concordância entre os resultados deve-se principalmente na baixa recuperação do método cromatográfico, com média de 89,6 %, enquanto que no método espectrofotométrico essa recuperação encontra-se por volta de 100 %. Uma das possíveis causas para a baixa recuperação do VCM é a estrutura da molécula em si, pois mesmo com controle de pH e adição de íons cloreto, ela conserva em sua estrutura um arranjo diferente do HVCM, o que resulta em uma menor interação com a coluna no método cromatográfico.

Porém, comparando a precisão através dos resultados do teste F, os valores calculados se encontram abaixo do valor teórico nos dois níveis de significância.

A tabela 7 mostra a comparação dos resultados obtidos com os dois métodos, considerando que o desvio padrão relativo aceito para métodos com propostas farmacêuticas é de ± 5 % (Brasil, 2003).

Tabela 7. Comparação estatística entre os resultados obtidos para os dois métodos (tabela 6) usando os desvios padrão admitidos para os dois métodos com base no critério de tolerância de precisão de 5% para análise de fármacos.

Excipiente	HVCM		
	Desvio - Método proposto	Desvio - HPLC	<i>t</i>
Amido	5,0	5,0	0,1
Celulose	5,2	4,9	1,1
Lactose	4,9	4,7	1,0
Sílica	5,0	5,5	1,7
	VCM		
Amido	5,0	4,4	2,4
Celulose	5,0	4,5	1,9
Lactose	5,2	4,5	2,9
Sílica	5,0	4,5	1,9

Com base nestes resultados, pode-se afirmar que os dois métodos são estatisticamente equivalentes em um nível de confiança de 0,99 tanto para HVCM e VCM. No nível de 0,95, apenas a lactose misturada à VCM apresenta um valor igual ao limite teórico do teste *t*.

4.5.7 Especificidade

Após submeter soluções do antibiótico a diferentes condições de pH e de oxidação, na temperatura de 80 °C (Shabir et al., 2003), não foi observada reação com cobre(II), tanto visualmente como medindo a absorbância no comprimento de onda de 555 nm. Isto foi feito tanto para VCM como para HVCM, evidenciando nos dois casos a especificidade da reação proposta nas condições otimizadas, e que produtos de degradação tanto da VCM como de HVCM não absorveram, o que demonstra mais uma vantagem do método proposto.

Capítulo 5

Conclusão

5. Conclusão

O método espectrofotométrico para determinação de vancomicina, (tanto em sua forma base - VCM, quanto na sua forma de cloridrato – HVCM), desenvolvido neste trabalho, mostrou ser rápido, de fácil execução, fornecendo resultados de boa qualidade no que se refere à precisão e à exatidão.

Foram obtidos os espectros de infravermelho da VCM e do HVCM, que, curiosamente, não são encontrados facilmente na literatura. Registrou-se, também, o DSC e a TGA das duas substâncias. Os resultados destas duas técnicas foram similares aos dados experimentais obtidos nos espectros de infravermelho, evidenciando a presença de água de cristalização tanto na VCM e no HVCM, no caso do infravermelho pela banda de transmitância na região de $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ e nas análises térmicas pela variação de massa e calor proveniente da liberação/degradação desta água.

Para o desenvolvimento do método espectrofotométrico foi feito o estudo de uma série de fatores que influenciam tanto na reação de complexação com íons cobre(II), quanto na solubilidade. Dentre esses parâmetros, destacam-se: o solvente e o pH.

A otimização dos parâmetros permitiu a construção de uma curva analítica com faixa linear entre $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) de $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

Foi também estudada a interferência de excipientes (amido, celulose, lactose e sílica) no que diz respeito à exatidão e à precisão. Os resultados obtidos, observando a estimativa de desvio padrão, são melhores do que aqueles obtidos com base no método HPLC utilizado e recomendado neste tipo de análise e tido como referência (Lunn, 2000; British Pharmacopeia, 2002; USP, 2005).

Em face aos resultados obtidos, pode-se sugerir o método desenvolvido neste trabalho para a análise quantitativa de vancomicina, tanto na forma base como na de cloridrato, em amostras do antibiótico “puro” como em preparações farmacêuticas, pelo menos naquelas que contém os excipientes estudados.

Capítulo 6

Perspectivas

6. Perspectivas

Em relação às perspectivas futuras, destaca-se o estudo da cinética de reação do complexo, para melhor entender o mecanismo de sua formação e também, a sua solubilidade. Sem dúvida, neste estudo deverá ser contemplado o estudo da influência do meio reacional.

O entendimento dos fatores que afetam a formação do complexo do cobre(II) com vancomicina poderá contribuir para o desenvolvimento de métodos reflectométricos de análise para a sua determinação, desde que se possa controlar a sua precipitação.

Ao término deste trabalho experimental, uma outra possibilidade era o desenvolvimento de método em fluxo, o que já foi feito com pleno sucesso (Vila et al., 2008).

Capítulo 7

Referências

Ackerman, B. H.; Berg, H. G.; Strate, R. G.; Rostschafer, J. C. Comparison of radioimmunoassay and fluorescent polarization immunoassay for quantitative determination of vancomycin concentrations in serum. *Journal Clinical Microbiology* 18(4): 994-995, 1983

Adamczyk, M.; Brate, E. M.; Chiappetta, E. G.; Ginsburg S.; Hoffman, E.; Klein, C.; Peerkowitz, M. M.; Rege, S. D.; Chou, P. P.; Costantino, A. G. Development of a quantitative vancomycin immunoassay for the Abbott AxSYM Analyzer . *Therapeutic Drug Monitoring* 20: 191-201, 1998

Anne, L.; Hammad, N.; Chang, C. C.; Laungani, D.; Gottwald, K.; Alexander, S.; Centofanti, J. Development of EMIT® assay for the measurement of vancomycin in serum. *Clinical Chemistry* 34 (6): 1256, 1988

Armstrong, D.; Tang, Y.; Chen, S.; Zhou, Y.; Bagwill, C.; Chen, J. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 66 (9): 1473-1484, 1994

Azzazy, H. M. E., Chou, P. P.; Tsushima, J. H.; Troxil S.; Gordon, M.; Avers, R. J.; Chiappetta, E.; Duh, S.; Christenson, R. H. Abbott AxSYM Vancomycin II Assay: multicenter evaluation and interference studies. *Therapeutic Drug Monitoring* 20: 202-208, 1998

Bauchet, J.; Pussard, E.; Garaud, J. J. Determination of vancomycin in serum and tissues by column liquid chromatography using solid-phase extraction. *Journal of Chromatography – Biomedical Applications* 414: 472-476, 1987

Belal, F.; El-Ashry, S. M; El-Kerdawy, M. M.; El-Wasseef, D. E. Voltametric determination of vancomycin in dosage forms through treatment with nitrous acid. *Arzneimittel-Forschung-Drug Research* 51 (9); 763-768, 2001

Betina, V. A systematic analysis of antibiotics using paper chromatography. *Journal of Chromatography* 15: 379-392, 1963

Blouin, R. A.; Bauer, L. A.; Miller, D. D.; Record, K. E.; Griffen, W. Vancomycin pharmacokinetics in normal and morbidly obese subjects. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 21 (4): 575-580, 1982

Bowhay, S.; Timms, P. Interference with vancomycin fluorescence polarisation immunoassay in a nonuraemic patient. *Therapeutic Drug Monitoring* 19: 117-119, 1997

Brasil, ANVISA, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

Calcutt, R.; Boddy, R. *Statistics for analytical chemists*, Chapman and Hall, 253p, Londres, 1983

Cass, T. R.; Villa, J. Karr; Schimdt Jr D. E. Rapid bioanalysis of vancomycin in serum and urine by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using on-line sample extraction and parallel analytical columns. *Rapid Communications Mass Spectrometry* 15: 406-412, 2001

Chabenat, C.; Andre, D.; Boucly, P. Formation d'un chelate cuivre-vancomycine: application au dosage de l'antibiotique en flux continu et detection amperometrique. *Talanta* 30 (12): 963-966, 1983

Crossley, K. B.; Rotschafer, J. C.; Chern, M. M.; Mead, K. E.; Zaske, D. E. Comparison of radioimmunoassay and microbiological assay for measurement of serum vancomycin concentrations. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 17 (4): 654-657, 1980

Davani, S.; Muret, P.; Royer, B.; Hoen, B.; Kantelip, J. P. Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique des principaux antibiotiques. *Annales de Biologie Clinique* 60: 655-661, 2002

Demotes-Mainard, F.; Labat, L.; Vinçon, G.; Bannwarth, B. Column-switching high-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in serum. *Therapeutic Drug Monitoring* 16: 293-297, 1994

Del Nozal, M. J.; Bernal, J. L. Pampliega, A.; Marinero, P.; López, M. I.; Coco, R. J. High-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in rabbit, vitreous and aqueous humour after intravitreal injection of the drug. *Journal of Chromatography A* 727: 231-238, 1996

Diana, J.; Visky, D.; Roets, E.; Hoogmartens, J. Development and validation of an improved for the analysis of vancomycin by liquid chromatography selectivity of reversed-phase columns towards vancomycin components. *Journal of Chromatography A* 996: 115-131, 2003

Eckschager, K. *Errors, measurement and results in chemical analysis*. Van Nostrand Reinhold, 155p, Londres 1972.

El-Ashry, S. M.; Belal, F.; El-Kerdawy, M. M.; Elwasseef, D. R. Spectrophotometric determination of some phenolic antibiotics in dosage forms. *Mikrochimica Acta* 135:191-196, 2000

Farin, D.; Piva, G. A.; Gozlan, I.; Kitzes-Cohen, R. A modified HPLC for the determination of vancomycin in plasma and tissues and comparison to FPIA (TDX). *Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis* 18: 367-372, 1998

Favetta, P.; Guiton, 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* 751: 377-382, 2001

Fong, K. L.; Ho, D. W.; Bogerd, L. Sensitive radioimmunoassay for vancomycin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 19:139-143, 1981

Fooks, R. J. ; McGilveray, I. J.; Strickland, R. D. Colorimetric assay and improved method for identification of vancomycin hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57 (2): 315-317, 1968

Forlay-Frick, P.; Nagy, Z.B.; Fekete, J.; Kettrup, A.; Gebefugi, I. Reverse phase HPLC method for determination of vancomycin in influenza vaccine. *Journal Liquid Chromatography & Related Technology*, 24 (4): 497-507, 2001

Gerhard, U.; Mackay, J. P.; Maplestone, R. A.; Williams, D. H. The role of sugar and chlorine substituents in the dimerization of vancomycin antibiotics. *Journal of the American Chemical Society* 115: 232-237, 1993

Ghassempour, A.; Aboul-Enein, H. Y. Vancomycin degradation products as potential chiral selectors in enantiomeric separation of racemic compounds. *Journal of Chromatography A* 1191: 182-187, 2008

Ghassempour, A.; Darbandi, M. K.; Asghari, F. S. Comparison of pyrolysis-mass spectrometry with high performance liquid chromatography for the analysis of vancomycin in serum. *Talanta* 55: 573-580, 2001

Haghedooren, E.; Diana, J.; Noszál, B.; Hoogmartens, J.; Adams, E. Classification of reversed-phase columns based on their selectivity towards vancomycin compounds. *Talanta* 71: 31-37, 2007

Hammett-Stabler, C. A.; Johns, T. Laboratory guidelines for monitoring of antimicrobial drugs. *Clinical Chemistry* 44 (5): 1129-1140, 1998

Heck, A. J. R.; Bonnici, P. J.; Breukink, E.; Morris, D.; Wills, M. Modification and inhibition of vancomycin group antibiotics by formaldehyde and acetaldehyde. *Chemical European Journal* 7: 910-916, 2001

Heck, A. J. R.; Jorgensen, T. J. D. Vancomycin in vacuo. *International Journal of Mass Spectrometry* 236: 11-23, 2004

Hermida, J.; Zaera, S.; Tutor, J. C. Therapeutic drug monitoring in the COBAS Integra 400 Analyzer Therapeutic Drug Monitoring 23: 725-727, 2001

Hosotsubo, H. Rapid and specific method for the determination of vancomycin in plasma by high-performance liquid chromatography on aminopropyl column. *Journal of Chromatography – Biomedical Applications* 487 (2):421-427, 1989

Hu, M W.; Anne, L.;Forni, T.; Gottwald K. Measurement of vancomycin in renally impaired patient samples using a new high-performance liquid chromatography method with vitamin B₁₂ internal standard: comparison of high-performance liquid chromatography, EMIT and fluorescence polarization immunoassay methods. *Therapeutic Drug Monitoring* 12:562, 569, 1990

Inman, E. Determination of vancomycin related substances by gradient high-performance liquid chromatography. *Journal Chromatography* 410: 363-372, 1987

ICH – International Conference on Harmonization , Q2b: Validation of Analytical Procedures, US FDA Federal Register, 62, 1997

Jehl, F; Gallion, C.;Thierry, R. C.; Monteil, H. Determination of vancomycin in human serum by high-pressure liquid chromatography. *Antimicrobial Agentes Chemoterapy* 27 (4): 503-507, 1985

Kirchmeier, R. L. & Upton, R. P. Simultaneous determination of vancomycin, anisomycin, and trimethoprim lactate by high pressure liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 50 (2): 349-351, 1978

Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, vol. 2, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1002-1003, 1978.

Kitahashi, T. & Furuta, I. Determination of vancomycin in human serum by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection. *Clin. Chim. Acta* 312: 221-225, 2001

Kucharczyk, M.; Brzezowska, M.; Maciag, A.; Lis, T.; Jezowska-Bojczuk, M. Structural features of Cu²⁺ - vancomycin complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102: 936-942, 2008

Kureishi, A.; Jewesson, P. J.;Bartlett, K. H.; Cole, C. D.; Chow, A.W. Application of a modified bioassay for monitoring serum teicoplanin and vancomycin in febrile neutropenic patients. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 34 (9): 1642-1647, 1990

Lam, M. T.; Le, X. C. Competitive immunoassay for vancomycin using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Analyst* 127: 1633-1637, 2002

Levine, D. Vancomycin: a history, *Clinical Infectious Disease* 42: S5-12, 2006

Lopes, H. V. O papel atual da vancomicina nas infecções estafilocócicas. *Revista Panamericana de Infectologia*, 9 (3): 70-71, 2007

Li, L.; Miles, M. V.; Hall, W.; Carson, S. W. An improved micromethod for vancomycin determination by high-performance liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring* 17 (4): 366-370, 1995

Luksa, J.; Marusic, A. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in human plasma. *Journal of Chromatography B* 667:227-281, 1995

Lunn, G. *HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis*. vol. 4, John Wiley & Sons Inc., p.1630-1631, Nova Iorque, 2000

McPhail, D.; Cooper, A. Thermodynamics and kinetics of dissociation of ligand-induced dimers of vancomycin antibiotics. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 93 (13): 2283-2289, 1997

McPhail, D.; Cooper, A.; Freer, A. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a vancomycin-N-acetyl-D-Ala-D-Ala complex. *Acta Crystallographica Section D* D55: 534-535, 1998

Metz, P.; Kohlhepp, S. J.; Gilbert, D. N. Study of different off-line sample processing procedure and the measurement of antibiotic and antiviral levels in human serum by high-performance liquid chromatography *Journal of Chromatography B* 773: 159-166, 2002

Nair, U.B.; Chang, S.S. C.; Armstrong, D. W.; Rawjee, Y.Y.; Eggleston, D.S.; McArdle, J.V. Elucidation of vancomycin's enantioselective binding site using its copper complex. *Chirality* 8 (8): 590-595, 1996

Najjar, T.; Al-Dhuwailie, A. A.; Tekle, A. Comparison of high-performance liquid chromatography with fluorescence polarization immunoassay for the analysis of vancomycin in patients with chronic renal failure. *Journal of Chromatography B* 672: 295-299, 1995

Nicolaou, K.C.; Snyder, S.A. *Classics in Total Synthesis II-More Targets, Strategies, Methods* Wiley-VCH, 239-300, 2003

Nowakowska, J.; Halkiewicz, J.; Lukasiak, J. W. TLC Determination of Selected Macrocyclic Antibiotics Using Normal and Reversed Phases. *Chromatographia*, 56: 367-373, 2002.

Pavia, D.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S., *Introduction to Spectroscopy*, 3rd edition, Brooks/Cole – Thomson Learning, 597p. 2003.

Pearce, C. M.; Williams, D. H. Complete assignment of the ¹³C NMR Spectrum of vancomycin. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions* 2, 153-157, 1995

Pearce, C. M.; Gerhard, U.; Williams, D. H. Ligands which bind weakly to vancomycin: Studies by ^{13}C NMR Spectroscopy. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions 2*, 159-162, 1995

Pohlod, D. J.; Saravolatz L. D.; Somerville, M.M. Comparison of fluorescence polarization immunoassay and bioassay of vancomycin. *Journal Clinical Microbiology* 20 (2): 159-161, 1984

Ristuccia, P. A.; Ristuccia, A. M.; Bidanset, J. H.; Cunha, B. A. Comparison of bioassay, high-performance liquid chromatography, and fluorescence polarization immunoassay for quantitative determination of vancomycin in serum. *Therapeutic Drug Monitoring* 6(2): 238-242, 1984

Santos, C. R.; Feferbaum, R.; Paula, M. L. S. A.; Bertoline, M. A.; Omosako, C. E. K.; Santos, S. R. C. J. 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* 37 (1): 87-93, 2001

Sastry, C. S. P.; Rao, T. S.; Rao, P. S. N. H. ; Prassa, U. V. Assay of vancomycin and dobutamine using sodium metaperiodate. *Mikrochimica Acta* 140: 109-118, 2002

Sautou-Miranda, V.; Libert, F.; Grand-Boyer, A.; Gellis, C.; Chopineau, J. Impact of deep freezing on the stability of 25mg/mL vancomycin ophthalmic solutions. *International Journal of Pharmaceuticals* 234: 205-212, 2002

Schäfer, M.; Schneider, T. R.; Sheldrick, G. M. Crystal Structure of Vancomycin. *Sturcture*, 4 (12): 1509-1515, 1996

Schrader, B. (editor) *Infrared and Raman Spectroscopy*, 787p, VCH, Weinheim, 1995

Shabir, G. A. Validation of high-performance of liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis – understanding the differences and similarities between validation requirements of U.S. food and Drug Administration, the U. S. Pharmacopeia, and the International Conference of Harmonization. *Journal of Chromatography A* 987: 57-66, 2003

Shamsi, S. A. Chiral capillary electrophoresis-mass spectrometry: models and applications. *Electrophoresis* 33: 4036-4051, 2002

Shibata, N.; Ishida, M.; Prasad, Y. V. R.; Gao, W.;Yoshikawa, Y.; Takada, K. Highly sensitive quantification of vancomycin in plasma samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and oral bioavailability in rats. *Journal of Chromatography B* 789: 211-218, 2003

Sheldrick, G. M.; Jones, P. G.; Kennard, O.; Williams, D. H.; Smith, G. A. Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine. *Nature* 271: 223-225, 1978

Silverstein, R. M.; Webster, F. X. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 6ª ed., 460p, LTC, Rio de Janeiro, 1998

Srinivasan, A.; Dick, J. D.; Perl, T. M. Vancomycin resistance in staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 15 (3): 430-438, 2002

Tavares, W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos*. 3º ed., 1216p, Atheneu, São Paulo, 2002,

The British Pharmacopeia, General Medical Council, London, 869, 1963

The British Pharmacopeia, British Pharmacopeia Commission, v.1, 1771-1772, Londres, 2002

The Merck Index, 20th edition: 1692-1693, 1996

The United States Pharmacopeia. The National Formulary, 28th ed., United States Pharmacopeial Convention, 2013-2014, Rockville, 2005

Tobin, C. M.; Darville, J. M.; Thomson, A. H.; Sweeney, G.; Wilson, J. F.; MacGowan, A. P.; White, L. O. 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 Antimicrobial Chemotherapy* 50: 713-718, 2002

Tseng, M. C.; Chang, Y. P.; Chu, Y. H. Quantitative measurements of vancomycin binding to self-assembled peptide monolayer on chips by quartz crystal microbalance. *Analytical Biochemistry* 371, 1-9, 2007

Tünnemann, R.; Mehlmann, R. D.; Bühler, B.; Pelzer, S.; Wohlleben, W.; Fielder, H.; Wiesmüller, K.; Gauglitz, G.; Jung, G. Optical biosensors. Monitoring studies of glycopeptide antibiotic fermentation using white light interference. *Analytical Chemistry* 73: 4313-4318, 2001

Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. A2, 5th edition, 530-531, VCH, 1985

Vila, M. M. D. C.; Oliveira, R. M.; Gonçalves, M. M.; Tubino, M. Analytical methods for vancomycin determination in biological fluids and pharmaceuticals. *Química Nova*, 30 (2): 395-399, 2007

Vila, M. M. D. C.; Salomão, A. A.; Tubino, M. Flow injection analysis of vancomycin. *Ecletica Quimica*, 33 (2): 67-72, 2008.

Walker, C. N. Bioassay for determination of vancomycin in the presence of rifampin or aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17 (4): 730-731, 1980

Walker, C. N.; Kopp, B. Sensitive bioassay for vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 13 (1): 30-33, 1978

Wang, Z. Y.; Wang, J. F.; Hu, Z. D.; Kang, J. W. Enantioseparation by CE with vancomycin as chiral selector: Improving the separation performance by dynamic coating of the capillary with poly(dimethylacrylamide). *Electrophoresis* 28 (6): 938-943, 2007

White, L.O.; Edwards, R.; Holt, H. A.; Lovering, A. M.; Finch, R.G.; Reeves, D.S. The in vitro degradation at 37 °C of vancomycin in serum, CAPD fluid and phosphate-buffered saline. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 22: 739-745, 1988

Yeo, K.; Traverse, W.; Horowitz, G. L. Evaluation of EMIT vancomycin assay on the Cobas-Bio. *Clinical Chemistry* 34 (6): 1257, 1988