

# Método físico-químico para doseamento de bacitracina

## A physicochemical method for quantitative analysis of bacitracin

Lauren C. Vaucher<sup>1</sup> & Elfrides E.S. Schapoval<sup>2</sup>

**RESUMO** – Foi desenvolvido método empregando espectrofotometria no visível para a determinação de bacitracina, matéria-prima e pomada que contém este antibiótico associado à neomicina. O método espectrofotométrico consiste na formação de complexo de cobre, utilizando uma solução de sulfato de cobre a 5% em hidróxido de sódio 2M. O quelato formado entre a bacitracina e o cobre dá origem a um complexo azul, estável, cuja absorção máxima ocorre em 550nm. O método espectrofotométrico descrito mostrou-se adequado para a determinação da bacitracina, pois, além de ser simples, rápido, eficiente e de baixo custo, seus resultados não diferiram significativamente quando comparados com aos obtidos pelo método microbiológico, que é o método oficial para a determinação deste antibiótico.

**PALAVRAS-CHAVE** – Bacitracina, determinação quantitativa, quelatos de cobre, método espectrofotométrico.

**SUMMARY** – A physicochemical method for quantitative analysis of bacitracin was tested, such as spectrophotometric by copper sulfate. The simple, rapid, efficient and inexpensive method based on chelates formation with copper was developed for the determination of this antibiotics using 5% copper sulfate solution in 2M NaOH. The chelate formed by the copper solution and the sample and standard bacitracin solutions gave origin to a stable blue color complex with maximum absorption at 550nm. Microbiological method is the official method recommended for the quantitative determination of bacitracin as a raw material and in dosage forms; however, the spectrophotometric method described here was suitable for the determination of bacitracin as a bulk drug and also in ointments containing the antibiotic associated with neomycin since their results were not significantly different from those obtained by the microbiological method.

**KEYWORDS** – Bacitracin, quantitative determination, spectrophotometric method, copper chelates.

## INTRODUÇÃO

A bacitracina foi isolada pela primeira vez, em 1943, a partir do *Bacillus subtilis*<sup>9,13</sup>. Constituem complexos polipeptídicos denominados bacitracina A, B, C, D, E, F e G. A estrutura A é o principal componente da bacitracina<sup>14</sup>, sendo um decapeptídeo cíclico com peso molecular de cerca de 1500, contendo em sua molécula um anel tiazolidina. É constituída exclusivamente de aminoácidos e classificada como peptídeo homeomérico. A forma mais utilizada é na forma de sal de zinco, pois o zinco aumenta a atividade do antibiótico e é mais estável<sup>6,15</sup>. O mecanismo de ação da bacitracina consiste na interferência da biossíntese da parede celular bacteriana<sup>13</sup>.

É um dos antibióticos mais comumente utilizados no mundo, seja em preparações farmacêuticas para uso humano ou associado à rações para alimentação animal, neste caso utilizado como promotor de crescimento<sup>3,18</sup>.

Em formas farmacêuticas para uso humano, seu maior emprego é associado ao antibiótico aminoglicosídico neomicina, em pomadas. Nestas preparações, a bacitracina deve ser extraída dos componentes da matriz, para que possa ser determinada sua atividade. Por este motivo, a bacitracina é ainda analisada quase que exclusivamente por métodos microbiológicos. O método oficial de doseamento deste antibiótico é o método microbiológico (cilindros em placas)<sup>16</sup>, tanto para matéria-prima como para preparações farmacêuticas. Outros métodos, como a cromatografia líquida de alta eficiência tem

sido utilizados para a separação e determinação dos constituintes da bacitracina<sup>3,4,12</sup>, assim como a cromatografia líquida associada à espectrometria de massas tem sido utilizada para a determinação da bacitracina-zinco em alimentos<sup>8</sup>. O presente artigo relata o desenvolvimento de um método físico-químico baseado na determinação espectrofotométrica de complexos de cobre formados com a bacitracina. Os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico foram comparados aos do método microbiológico visando a validação do mesmo para que possa ser empregado durante a produção de produtos que contenham estes antibióticos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Materiais

#### Reagentes, substâncias químicas de referência e amostras

Foram utilizados reagentes de grau analítico, procedência Merck. Solução de sulfato de cobre a 5% em ácido sulfúrico 0,005M, solução de hidróxido de sódio 2,0M, tampão fosfato nº 1 pH 6,0, tampão fosfato nº 6 pH 6,0.

Substâncias químicas de referência: bacitracina zinco (potência estimada 73U/mg) e neomicina base (potência estimada 661µg/mg) fornecidos pelo Laboratório Farmacêutico do Estado do Rio Grande do Sul (LAFERGS).

As amostras utilizadas foram bacitracina zinco, matéria-prima e pomada de bacitracina zinco 2.500UI mais neomicina 77mg, (lote 8605053, fornecidas pelo LAFERGS).

Recebido em 29/5/2001

<sup>1</sup>Departamento de Farmácia Industrial, UFSM/RS, CEP 97119-900, Brasil; <sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, UFRS, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS, Brasil

## Equipamentos

Espectrofotômetro Vis-UV "Perkin Elmer" 124 com registrador modelo 56-1001 com cubetas de 1cm para obtenção das curvas de absorção em intervalos de 400-700nm. Espectrofotômetro "Zeiss" PM 2<sup>A</sup> com cubetas de 1cm para determinação das absorvâncias.

## Métodos

### Espectrofotometria no visível

#### Curva de Absorção

Para a determinação do comprimento de onda de absorção máxima, foram obtidos complexos de cobre utilizando-se 10ml da substância de referência bacitracina-zinco na concentração de 100UI/ml em ácido clorídrico 0,1M (SR), 1ml de solução de sulfato de cobre a 5% (SR) e 1ml de hidróxido de sódio 2M (SR). Obteve-se a curva de absorção deste complexo no intervalo de 400-700nm, utilizando-se cubetas de 1cm e como branco ácido clorídrico 0,1M (SR).

#### Preparo das curvas-padrão

Pesou-se 34,25mg de bacitracina zinco, dissolveu-se em ácido clorídrico 0,1M, em balão volumétrico de 25mL obtendo-se a concentração de 100UI/mL. Esta solução foi diluída em soluções de concentração de 20, 30, 40, 50 e 60UI/mL utilizando tampão fosfato n° 1 pH 6,0. As absorvâncias usadas na elaboração desta curva correspondem à média de cinco determinações.

#### Preparo das amostras

##### Bacitracina Zinco – matéria-prima

Foram pesadas exatamente 34,25mg, que foram dissolvidas em balão volumétrico de 25ml completando-se o volume com HCl 0,1M, obtendo-se concentração de 100UI/ml. Esta solução foi posteriormente diluída utilizando-se tampão fosfato n° 1 pH 6,0, para a obtenção da solução de 40UI/ml.

##### Pomada de bacitracina zinco e sulfato de neomicina

Foram pesadas 40,0g de pomada e adicionados 100ml de éter etílico, homogeneizando-se até completa dissolução. A suspensão obtida foi colocada em ampola de separação de 250ml. Adicionou-se 25ml de HCl 0,1M, agitou-se e após separação das camadas, removeu-se a camada ácida. Esta operação foi repetida por três vezes. Os extratos ácidos foram reunidos em balão volumétrico de 100ml, completando-se o volume com ácido clorídrico 0,1M, obtendo-se concentração correspondente a 100UI/ml do antibiótico. Filtrou-se em papel de filtro realizando-se nova diluição usando tampão fosfato n° 1 pH 6,0 para obtenção de uma solução de 40UI/ml.

#### Ensaio

A cada 10ml da substância de referência, matéria-prima e amostras de pomada de bacitracina zinco na concentração de 40UI/ml, foram adicionados 1ml de solução de sulfato de cobre a 5% e 1ml de hidróxido de sódio 2M. Agitou-se, deixando-se em repouso por 5 minutos. O precipitado de hidróxido cúprico formado foi separado por centrifugação a

4.000rpm durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados seguindo-se as determinações das absorvâncias em 550nm. A média das absorvâncias foi interpolada na curva-padrão para obtenção dos valores para o cálculo dos percentuais dos antibióticos.

#### Método microbiológico

Para a determinação da potência da matéria-prima e das amostras de pomada de bacitracina-zinco+neomicina, foi utilizada a técnica descrita na farmacopéia americana (USP 23).

## RESULTADOS

Através da observação da curva de absorção<sup>17</sup> foi escolhido o comprimento de onda de 550nm, no qual foi obtida a absorção máxima do complexo de cobre-bacitracina.

O gráfico da curva-padrão, o coeficiente de correlação e a equação da reta para a representação gráfica obtida através do estudo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados são mostrados na Fig. 1. Os resultados obtidos demonstraram a existência de correlação linear positiva, sendo que o coeficiente de correlação próximo à unidade mostra a linearidade do método, que cumpriu a lei de Lambert-Beer. O intervalo de confiança para o intercepto incluiu o zero, o que permite descartar a existência de erro sistemático.

Os resultados obtidos através do método espectrofotométrico com sulfato de cobre foram comparados com os resultados obtidos pelo método microbiológico e estão apresentados na Tab. I. A análise da variância foi realizada com os valores obtidos nos dois métodos e demonstrou não haver diferença significativa entre os mesmos, para um nível de significância de 0,05% (Valor de F calculado = 1,02; valor de F tabelado = 5,31)

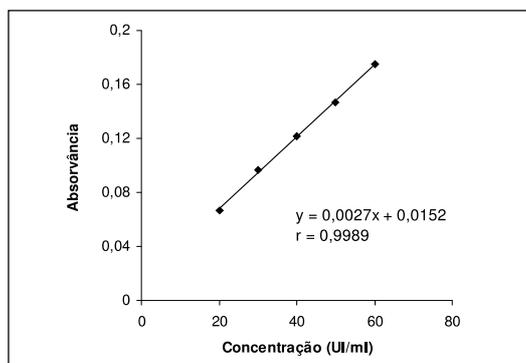


FIG. 1 - Curva-padrão para o doseamento da bacitracina pelo método espectrofotométrico no visível a 550nm.

TABELA I

Resultados obtidos no doseamento da bacitracina matéria-prima e pomada através dos métodos microbiológico e espectrofotométrico

	Microbiológico		Espectrofotométrico	
	Matéria-prima	Pomada	Matéria-prima	Pomada
Média	95,14*	97,65**	98,12*	99,53**
Desvio-padrão	0,603	0,731	0,202	0,94
CV%	0,633	0,74	0,206	0,94

\* Corresponde à média de três determinações; \*\* Corresponde à média de quatro determinações

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A complexação de um grupo funcional poliaminado e um íon metálico, no caso o cobre forma anéis queláticos conhecidos como complexos de coordenação. São compostos que contêm um íon central, geralmente um metal, rodeado por um grupo de moléculas ou íons que tendem a manter sua identidade mesmo em solução<sup>11</sup>. Este quelato é formado em um único estágio, onde uma única molécula orgânica é capaz de em uma só etapa satisfazer o número de coordenação do cobre<sup>2</sup>.

A bacitracina zinco apresenta em sua estrutura centros de nucleofilia bem definidos: grupamentos aminos ( $\text{NH}_2$ ) e átomos de nitrogênio em anéis heterocíclicos. Estes centros são responsáveis pela que- lação do  $\text{Cu}^{+2}$  produzindo um complexo azul de intensidade variada conforme a concentração de antibiótico. A aplicação desta metodologia para a bacitracina foi executada obtendo-se perfeita discriminação entre o aumento da concentração de antibiótico e as absorvâncias correspondentes. Este método, quando aplicado nos produtos acabados pode sofrer a interferência da neomicina, que possui estrutura química favorável à complexação com o cobre<sup>1,5</sup>.

Entretanto, na pomada de bacitracina zinco + neomicina, a neomicina encontra-se na forma de sulfato, o que facilita a especificidade da reação para a bacitracina zinco em alcalinidade adequada. Foram experimentadas concentrações variáveis de soluções de hidróxido de sódio para cada um dos antibióticos isoladamente. A alcalinidade conferida pela solução 1,0M não possibilita desenvolvimento de cor na reação entre sulfato de cobre e os antibióticos. A solução 2,0M favorece a complexação do cobre com a bacitracina e não com o sulfato de neomicina enquanto que a solução 3,0M desenvolve cor com ambos antibióticos<sup>17</sup>. Neste caso, supõe-se que a concentração 3M desloque a neomicina de seu sal ficando na forma de base, deixando os grupamentos amino livres, habilitando-a a complexação com o cobre<sup>7,10</sup>.

O conjunto de resultados obtidos mostra que a espectrofotometria pelo sulfato de cobre pode ser utilizada como método físico-químico alternativo para doseamento da bacitracina-zinco em matéria-prima e produtos acabados associados ou não à neomicina, pois, em alcalinidade adequada, mostrou seletividade, permitindo a quantificação da bacitracina, mesmo em presença da neomicina.

## REFERÊNCIAS

1. Baptista, E.R. Contribuição ao estudo do antibiótico neomicina na forma farmacêutica pomada. Porto Alegre: UFRGS, 1980. 57p. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
2. Basolo, F. & Johnson, R. Química de los compuestos de coordinación. Barcelona: Revérte, 174p., 1978.
3. Bell, R.G. Separation and isolation of the isomers of bacitracin by high-performance liquid chromatography and their relationship to microbial activity. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 9 (10-12):843-847, 1991.
4. Bell, R.G. Preparative high-performance liquid-chromatographic separation and isolation of bacitracin components and their relationship to microbiological activity. *Journal of Chromatography*, 590 (1):163-168, 1992.
5. Evangelista, R.C. Contribuição ao controle de qualidade de produtos farmacêuticos de antibióticos aminoglicosídicos. Porto Alegre: UFRGS, 1981. 108p. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
6. Harvey, S.C. Antimicrobial drugs. In: Remington's pharmaceutical sciences, 18ª ed. Mack, Easton, 1990.
7. Hendrickson, J.B., Cram, D. J., Hammond, G. S. Organic chemistry, 3 ed. New York: McGraw-Hill, 1279p., 1970.
8. Hormazabal, V. & Yndestad, M. Rapid assay for the determination of zinc bacitracin in feed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23 (7): 1083-1088, 2000.
9. Korolkovas, A. & Burckhalter, J.H. Química Farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982.
10. Morrison, R.T. & Boyd, R.N. Química Orgânica. 10ª ed., Lisboa: Calouste - Gulbenkian, 1993.
11. Ohlweiller, O.A. Química analítica quantitativa. 2ª ed., Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1982.
12. Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, N., Yamada, M., Harada, K., Yamazaki, Y., Suzuki, M. Improvement of chemical analysis of antibiotics. 15. Isocratic high-performance liquid-chromatographic methods for the analysis and preparative separation of the components of bacitracin. *Journal of chromatography*, 462:315-322, 1989.
13. Sande, M.A. & Mandell, G.L. Fármacos antimicrobianos (continuação). In: Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P., Eds. Goodman e Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. 8ª Ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1991.
14. Terabe, S., Konaka, R. & Shoji, J. Separation of polymyxins and octapeptides by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 173: 312-20, 1979.
15. The Merck Index, 12ª ed., Rahway, 1989.
16. United States Pharmacopeia, 23ª ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 1995.
17. Vaucher, L.C. Métodos físico-químicos para doseamento de antibióticos polipeptídicos - bacitracina e polimixina B. Porto Alegre: UFRGS, 1987. 126p. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
18. Webster, G.K. Liquid chromatographic analysis of bacitracin methylene disalicylate in feed. *Journal of AOAC international*, 80 (4): 732-735, 1997.