UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Teor de apramicina:

**Desenvolvimento e validação de método empregando
cromatografia líquida de alta eficiência comparativamente a um
doseamento microbiológico**

Elisabete de Almeida Barbosa

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Teor de apramicina:

**Desenvolvimento e validação de método empregando
cromatografia líquida de alta eficiência comparativamente a um
doseamento microbiológico**

Elisabete de Almeida Barbosa

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo

2009

Elisabete de Almeida Barbosa

Teor de apramicina:
Desenvolvimento e validação de método empregando cromatografia
líquida de alta eficiência comparativamente a um doseamento
microbiológico

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientadora/Presidente

Profa. Dra. Nádia Araci Bou Chacra
1º examinadora

Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca
2º examinadora

São Paulo, 03 de agosto de 2009.

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho com amor e carinho à minha família, em especial:

À minha mãe, *Edna*, e ao meu pai, *José*, pelo exemplo de coragem, trabalho e amor, aos quais devo minha existência e formação e orientação de vida.

Ao meu querido e amado namorado, *Rogério*, pela compreensão, paciência, auxílio e incentivo, sempre demonstrando todo o seu carinho e amor por mim em todos os momentos.

Aos meus irmãos *Alínia* e *João Paulo*, pelo companheirismo, amizade e apoio.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus e a nosso Senhor Jesus Cristo pelo dom da vida, pela sabedoria, por terem me dado luz e força para que eu concluísse mais essa importante etapa em minha vida.

À Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, pelo exemplo pessoal e profissional, orientação, apoio, confiança e amizade.

Ao Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela oportunidade de crescimento e aprimoramento.

Aos amigos Daniela Dal Molim Ghisleni e Felipe Rebello Lourenço pelo incentivo e por toda atenção, disponibilidade e auxílio prestados durante a execução deste trabalho.

Às colegas do CONFAR – Microbiológico: Cleide, Diane, Gláucia e Sueli por toda a ajuda prestada na execução do doseamento microbiológico.

Aos colegas do CONFAR – Físico-Químico: Andréa, Anna Carolina, Vivianne, Marcus, Rita, Josiane, Rosa e Marly, pelo companheirismo e amizade.

À secretária Elizabete Claro de Souza Paiva por toda ajuda, dedicação e compreensão.

À secretária Elaine Midori Ychico por todo o auxílio prestado na revisão e correção deste trabalho.

À bibliotecária Leila Aparecida Bonadio, pela revisão das referências bibliográficas.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, tornaram possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	Antibióticos aminoglicosídeos – considerações gerais	23
2.2	Apramicina	25
2.2.1	Características estruturais e químicas	25
2.2.2	Mecanismo de ação	27
2.2.3	Farmacologia	28
2.2.4	Uso terapêutico	28
2.2.5	Impacto ambiental	29
2.3	Métodos de determinação de apramicina	30
2.3.1	Ensaio microbiológico turbidimétrico	30
2.3.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	34
2.3.2.1	Generalidades sobre CLAE	34
2.3.2.2	A CLAE na análise de aminoglicosídeos	40
2.3.2.3	Emprego da CLAE na análise de apramicina	46
2.3.3	Outros métodos para determinação de apramicina	46
2.4	Validação de métodos analíticos	47
2.4.1	Fundamentos gerais	47
2.4.2	Parâmetros de validação	48
2.4.2.1	Robustez	50
2.4.2.2	Especificidade e seletividade	50
2.4.2.3	Linearidade e faixa linear de trabalho	52
2.4.2.4	Precisão	52
2.4.2.5	Exatidão	53
2.4.2.6	Limite de detecção	54
2.4.2.7	Limite de quantificação	55

2.4.2.8	Revalidação de metodologias analíticas	56
3	OBJETIVO	57
4	MATERIAL E MÉTODO	58
4.1	Material	58
4.1.1	Material objeto de estudo	58
4.1.2	Padrões de referência	58
4.1.3	Equipamentos	58
4.1.4	Reagentes	59
4.1.5	Microrganismo-teste	60
4.2	Método	61
4.2.1	Desenvolvimento do método físico-químico por CLAE	61
4.2.1.1	Preparo das soluções e fase móvel empregadas	61
4.2.1.2	Procedimento de derivatização – utilização do reagente de derivatização de OPA adquirido pronto para uso	62
4.2.1.3	Procedimento de derivatização – utilização da solução de derivatização OPA I/OPA II	63
4.2.1.4	Condições do sistema cromatográfico empregadas no início do desenvolvimento do Método	63
4.2.2	Validação do método cromatográfico recém-desenvolvido	64
4.2.2.1	Preparo das soluções empregadas	64
4.2.2.2	Preparo da solução padrão estoque de apramicina para robustez	64
4.2.2.3	Preparo das soluções padrão para linearidade	65
4.2.2.4	Preparo das soluções sob degradação forçada para seletividade	66
4.2.2.5	Preparo das amostras para o teste de exatidão	68
4.2.2.6	Preparo dos padrões para os limites de detecção e de quantificação	69
4.2.2.7	Procedimento de derivatização	70

4.2.2.8	Condições nominais do sistema cromatográfico do método recém-desenvolvido empregadas durante a validação e o doseamento de apramicina	70
4.2.3	Doseamento de apramicina pelo método físico-químico por CLAE	71
4.2.4	Ensaio microbiológico turbidimétrico	72
4.2.4.1	Preparo das soluções e meios de cultura empregados	72
4.2.4.2	Padronização da suspensão de <i>Salmonella choleraesuis</i>	75
4.2.4.3	Teste preliminar	76
4.2.4.4	Doseamento de apramicina pelo método microbiológico	76
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	77
5.1	Desenvolvimento do método físico-químico: testes preliminares	77
5.1.1	Estabelecimento das condições cromatográficas preliminares	77
5.1.2	Testes iniciais	78
5.1.3	Adequação do sistema cromatográfico - alterações na coluna e na composição da fase móvel	82
5.1.4	Substituição da solução de derivatização de OPA e alterações no modo de detecção	87
5.2	Desenvolvimento do método físico-Químico: otimização do método	93
5.2.1	Otimização do modo de detecção	93
5.2.2	Escolha do melhor procedimento de derivatização	98
5.2.3	Verificação da seletividade em relação à tobramicina	102
5.2.4	Definição da concentração de OPA em relação à concentração de apramicina	106
5.3	Método físico-químico: validação do método analítico por CLAE	113
5.3.1	Robustez	113
5.3.2	Especificidade/Seletividade	120
5.3.3	Linearidade	128
5.3.4	Precisão	129
5.3.5	Exatidão	131

5.3.6	Limites de quantificação e de detecção	132
5.4	Determinação do teor de apramicina pelo método físico-químico por CLAE	135
5.5	Método microbiológico: teste preliminar	137
5.6	Método microbiológico: determinação do teor de apramicina pelo método turbidimétrico	140
5.7	Comparação estatística entre os métodos turbidimétrico e por CLAE	142
6	CONCLUSÕES	146
7	REFERÊNCIAS	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química da apramicina	26
Figura 2.	Esquema simplificado dos componentes de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência	36
Figura 3.	Perfil cromatográfico da sol. padrão teste de apramicina (A) e do branco (B) após derivatização com reagente de OPA pronto para uso	79
Figura 4.	Esquema da reação do <i>o</i> -ftalaldeído e uma amina primária na presença de um tiol	80
Figura 5.	Sobreposição dos cromatogramas obtidos da solução padrão teste de apramicina após derivatização com OPA pronto em diferentes tempos de reação	81
Figura 6.	Perfil cromatográfico de sol. padrão teste de apramicina derivatizada com solução de OPA – Injeção 2	85
Figura 7.	Perfil cromatográfico de sol. padrão teste de apramicina derivatizada com solução de OPA – Injeção 3.....	86
Figura 8.	Perfil cromatográfico de sol. padrão teste de apramicina derivatizada com solução de OPA – Injeção 4	86
Figura 9.	Perfil cromatográfico de sol. padrão teste de apramicina derivatizada com solução de OPA degradada	88
Figura 10.	Sobreposição dos cromatogramas obtidos da solução padrão teste de apramicina após derivatização com solução OPA nova (A) e com a solução de OPA degradada (B)	89
Figura 11.	Perfil cromatográfico da sol. padrão teste de apramicina após derivatização com sol. OPA preparada segundo o artigo de ZHANG e cols.(2007)	90
Figura 12.	Perfil cromatográfico da sol. padrão teste de apramicina após derivatização com sol. OPA preparada segundo BP 2008 e USP XXXII – Detecção UV em 354 nm	91
Figura 13.	Perfil cromatográfico da sol. padrão teste de apramicina após derivatização com sol. OPA preparada segundo BP 2008 e USP XXXII –	

	Detecção por fluorescência (exc. 230nm; em. 390 nm)	91
Figura 14.	Espectro de varredura na região do UV da solução padrão teste de apramicina derivatizada com solução de OPA preparada em presença de ácido mercaptoacético, conforme BP 2004 e USP XXXII	94
Figura 15.	Perfil cromatográfico da sol. padrão teste de apramicina após derivatização com sol. OPA preparada segundo BP 2008 e USP XXXII - Detecção UV em 332 nm	95
Figura 16.	Perfil cromatográfico da sol. padrão teste de apramicina após derivatização com sol. OPA preparada segundo BP 2008 e USP XXXII - Detecção UV em 236 nm.	95
Figura 17.	Perfil cromatográfico do branco após derivatização com sol. OPA preparada segundo BP 2008 e USP XXXII - Detecção – UV em 332 nm .	96
Figura 18.	Gráfico comparativo área x tempo da estabilidade do derivado apramicina-OPA com uso de 2-mercaptoetanol e detecção por fluorescência e com o uso de ác. mercaptoacético e detecção por UV	97
Figura 19.	Perfil cromatográfico da sol. padrão teste de apramicina derivatizada com OPA e ác. mercaptoacético conforme USP XXXII (aquecimento e uso de isopropanol como diluente)	99
Figura 20.	Perfil cromatográfico da sol. padrão teste de apramicina derivatizada com OPA e ác. mercaptoacético conforme USP XXXII (aquecimento uso de metanol como diluente)	100
Figura 21.	Gráfico comparativo área x tempo para a solução padrão teste de apramicina derivatizada com OPA e ác. mercaptoacético em meio a água purificada, isopropanol e metanol	101
Figura 22.	Perfil cromatográfico da sol. padrão teste de apramicina + tobramicina derivatizada com OPA e ác. mercaptoacético	104
Figura 23.	Perfil cromatográfico da sol. padrão teste de apramicina derivatizada com OPA em meio a ác. mercaptoacético	104
Figura 24.	Perfil cromatográfico da sol. padrão teste de tobramicina derivatizada com OPA e ác. mercaptoacético	105

Figura 25.	Sobreposição e comparação dos cromatogramas das soluções padrão utilizadas no teste de seletividade	106
Figura 26.	Gráfico comparativo Área x tempo de formação e decaimento do derivado apramicina-OPA com o uso de diferentes proporções de concentração de OPA em relação à de apramicina	108
Figura 27.	Sobreposição dos cromatogramas da sol. padrão teste de apramicina e da solução amostra preparadas, derivatizadas e injetadas nas condições nominais do método recém-desenvolvido	112
Figura 28.	Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de apramicina obtidos nas condições nominais, mas com diferentes composições de fase móvel	115
Figura 29.	Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de apramicina obtidos nas condições nominais, com diferentes preparos de fase móvel	115
Figura 30.	Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de apramicina obtidos nas condições cromatográficas nominais, mas com diferentes proporções entre as concentrações de OPA/Apramicina	116
Figura 31.	Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de apramicina obtidos nas condições nominais, mas com diferentes temperaturas da coluna	116
Figura 32.	Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de apramicina obtidos nas condições nominais, com diferentes lotes de coluna	117
Figura 33	Gráfico de dispersão dos resultados médios obtidos de área do pico/concentração de apramicina para as 3 injeções efetuadas nas 8 condições cromatográficas estudadas	119
Figura 34	Comparação entre os perfis cromatográficos da solução de apramicina e solução placebo após uma hora de hidrólise ácida com os perfis cromatográficos da sol. padrão trabalho 100% apramicina e do diluente ..	122
Figura 35	Comparação entre os perfis cromatográficos da solução de apramicina e solução placebo submetidas à 2 hs de hidrólise alcalina com os perfis cromatográficos da sol. padrão trabalho 100% apramicina e do diluente ..	122

Figura 36.	Comparação entre os perfis cromatográficos da solução de apramicina e solução placebo submetido a uma hora de oxidação com os perfis cromatográficos da sol. padrão trabalho 100% apramicina e do diluente ..	123
Figura 37.	Comparação entre os perfis cromatográficos da solução de apramicina e solução placebo submetidas à 2 horas de degradação térmica com os perfis cromatográficos da sol. padrão trabalho 100% apramicina e do diluente	123
Figura 38.	Comparação entre o perfil cromatográfico da solução de apramicina após 2 horas de hidrólise ácida e ajuste de pH com o perfil cromatográficos da sol. padrão trabalho 100% apramicina	126
Figura 39.	Comparação entre o perfil cromatográfico da solução de apramicina após 2 horas de hidrólise alcalina e ajuste de pH com o perfil cromatográficos da sol. padrão trabalho 100% apramicina	126
Figura 40.	Curva de calibração média Área pico apramicina <i>versus</i> Concentração de apramicina construída com base nas 3 curvas de calibração utilizadas na avaliação da linearidade do método	129
Figura 41.	Perfil cromatográfico da solução de apramicina de concentração 0,08 µg/mL (derivatizada com OPA em meio a ác. mercaptoacético) utilizada na determinação do limite de detecção	133
Figura 42.	Perfil cromatográfico da solução de apramicina de concentração 0,08 µg/mL (derivatizada com OPA em meio a ác. mercaptoacético) utilizada na determinação do limite de quantificação	134
Figura 43.	Representação gráfica da curva de calibração Área <i>versus</i> Concentração de apramicina e equação da reta obtida pelo método físico-químico de doseamento de apramicina por CLAE	136
Figura 44.	Representação gráfica da curva de calibração % Transmitância <i>versus</i> Log concentração de apramicina e equação da reta obtida pelo método microbiológico turbidimétrico de determinação de apramicina	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação dos métodos analíticos	48
Tabela 2.	Conjunto de testes exigidos para validação dos métodos analíticos	49
Tabela 3.	Tomadas de ensaio de apramicina padrão de referência utilizadas no preparo das soluções padrão estoque de apramicina utilizadas para o teste de linearidade	66
Tabela 4.	Valores das massas pesadas de apramicina padrão de referência para os respectivos níveis de concentração utilizados no teste de recuperação	69
Tabela 5.	Valores das massas pesadas para cada amostra dos 3 lotes de pó oral solúvel empregadas no doseamento de apramicina pelo método físico- químico por CLAE	71
Tabela 6.	Valores das massas pesadas para cada amostra dos 3 lotes de pó oral solúvel empregadas no doseamento de apramicina pelo método microbiológico turbidimétrico	74
Tabela 7.	Variação da área do pico da apramicina conforme o tempo de reação de derivatização	81
Tabela 8.	Variações realizadas na composição da fase móvel e do tipo de coluna empregada para os testes de adequação do sistema cromatográfico	84
Tabela 9.	Resultados obtidos para os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico em função das diferentes condições empregadas (coluna e/ou composição da fase móvel)	84
Tabela 10.	Áreas do pico referente à apramicina obtidas ao longo de 300 minutos de reação após sucessivas injeções de cada uma das quatro soluções padrão com diferentes proporções entre as concentrações finais de OPA e de apramicina	109
Tabela 11.	Relação das condições nominais e das modificações efetuadas para cada parâmetro cromatográfico nos testes de avaliação da robustez	114
Tabela 12.	Resultados médios dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico obtidos para as injeções da solução padrão de apramicina realizadas nas condições nominais do método e em cada uma das condições modificadas ..	118

Tabela 13.	Testes de seletividade: Áreas obtidas para o pico referente à apramicina nos distintos tipos de degradação forçada e comparação das mesmas com a área obtida para o mesmo pico na solução padrão não-degradada	121
Tabela 14.	Teste de seletividade: Áreas obtidas para o pico referente à apramicina na hidrólise ácida e alcalina com ajuste de pH antes da reação de derivatização e comparação das mesmas com a área do mesmo pico para a solução padrão não-degradada	127
Tabela 15.	Concentrações das soluções padrão de trabalho empregadas em cada uma das 3 curvas de calibração construídas e as respectivas áreas médias obtidas para o pico referente à apramicina	128
Tabela 16.	Valores das áreas dos picos referentes à apramicina nas injeções consecutivas realizadas em cada um dos 3 dias de teste utilizados na avaliação da repetibilidade e precisão precisão inter-dia	130
Tabela 17.	Concentração de apramicina adicionada e recuperada em cada nível estudado	131
Tabela 18.	Porcentagem de apramicina recuperada em cada nível de concentração em estudo	132
Tabela 19.	Áreas médias obtidas para o pico referente à apramicina das soluções empregadas na determinação dos limites de detecção e de quantificação ..	135
Tabela 20.	Resultados do teor de apramicina obtidos para cada um dos três lotes de pó oral solúvel analisados pelo método recém-desenvolvido por CLAE ...	136
Tabela 21.	Leituras de transmitância obtidas no ensaio preliminar de doseamento microbiológico de apramicina por turbidimetria	138
Tabela 22.	Leituras de transmitância obtidas para os controles-positivos de cada meio utilizado no ensaio preliminar de doseamento microbiológico de apramicina por turbidimetria	138
Tabela 23.	Resultados do teor de apramicina obtidos para cada um dos três lotes de pó oral solúvel analisados pelo ensaio microbiológico turbidimétrico	141
Tabela 24.	Comparação Estatística entre os resultados da determinação do teor de apramicina pelo método físico-químico por CLAE e o método microbiológico turbidimétrico para o lote A	143

Tabela 25.	Comparação Estatística entre os resultados da determinação do teor de apramicina pelo método físico-químico por CLAE e o método microbiológico turbidimétrico para o lote B	144
Tabela 26.	Comparação Estatística entre os resultados da determinação do teor de apramicina pelo método físico-químico por CLAE e o método microbiológico turbidimétrico para o lote C	144

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BP	British Pharmacopoeia
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonization
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
OPA	<i>o</i> -Phthalaldehyde (<i>o</i> -Ftalaldeído)
USP	United States Pharmacopoeia

RESUMO

A apramicina é um antibiótico aminoglicosídeo produzido por uma cepa de *Streptomyces tenebrarius*, utilizada na medicina veterinária na forma de sulfato para tratar e prevenir doenças infecciosas produzidas por bactérias gram-negativas em porcos, bezerros e aves domésticas. As preparações comercialmente disponíveis são injetável, premix para adição em rações e pó oral solúvel, sendo esta última objeto de estudo deste trabalho. A Farmacopéia Britânica é o único compêndio oficial que descreve a apramicina (tanto a matéria-prima quanto as preparações) e recomenda o método microbiológico turbidimétrico para o seu doseamento. Embora os métodos microbiológicos ainda sejam os métodos de escolha na determinação da potência de antibióticos, há uma tendência crescente em substituí-los pelos métodos físico-químicos, sobretudo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a qual proporciona sensibilidade, especificidade, exatidão e precisão; ela já vem sendo usada com sucesso na determinação do teor de antibióticos, embora a sua potência possa estar sujeita a confirmação por um método microbiológico. Considerando-se as vantagens da CLAE, bem como a inexistência de métodos físico-químicos oficiais para a análise de apramicina, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método empregando a cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de apramicina em pó oral solúvel, bem como correlacioná-lo com o método turbidimétrico. Foi desenvolvido um método por CLAE empregando fase reversa com o uso de uma coluna C18 de 150 mm x 4,6 mm x 4 µm, derivatização pré-coluna com *o*-ftalaldeído (OPA) e detecção por UV em 332 nm. A metodologia proposta foi validada de acordo com normas dos compêndios oficiais e apresentou: boa robustez; linearidade no intervalo de 0,02 a 0,05 mg/mL com obtenção de uma curva de calibração de equação igual a $y = 132887304,980x + 127223,837$ e coeficiente de correlação linear de 0,9999; boa precisão, sendo o DPR < 1,0% para a precisão intra-dia e DPR = 1,1% para a precisão inter-dia; 99,33% de recuperação média, demonstrando exatidão; sensibilidade, com limites de detecção e de quantificação de 0,08 e 0,25 µg/mL, respectivamente. Três lotes de apramicina pó oral solúvel foram analisados pelo método por CLAE e pelo método microbiológico oficial e a comparação estatística entre os resultados obtidos através do Teste T demonstrou que não houve diferença significativa entre ambos no nível de $\alpha = 0,05$.

Palavras-chave: Apramicina. CLAE. Método Turbidimétrico. Derivatização. *o*-Ftalaldeído.

ABSTRACT

Apramycin is an aminoglycoside antibiotic produced by *Streptomyces tenebrarius* strain, widely used in veterinary medicine under sulfate form to treat and prevent infectious diseases induced by gram-negative bacteria in swines, calves and poultry. The commercially available preparations consist of injections, additive feed (premix) and soluble oral powder, being the latter the aim of this work. British Pharmacopoeia is the only official compendium that describes apramycin (bulk pharmaceutical and its formulations) recommending the microbiological turbidimetric method for its dosage. Although microbiological methods are still of chosen for the determination of antibiotics potency, there is an increasing tendency of replacing them by physico-chemical methods, mainly high performance liquid chromatography (HPLC), which offers sensitivity, specificity, accuracy, and precision; it has been successfully used in the determination of antibiotic assay, although its potency may be subjected to confirmation by a microbiological method. Taking into account the advantages of HPLC as well as the absence of official physico-chemical methods to analyze apramycin, the aim of the present work was to develop and validate a method employing high performance liquid chromatography to the quantification of soluble oral powder, as well as to compare it with the turbidimetric method. A HPLC method was developed employing reverse phase with a C18 column of 150 mm x 4,6 mm x 4 μ m, pre-column derivatization with OPA (*o*-phthalaldehyde) and UV detection at 332 nm. The proposed method was validated according to official compendia guidelines, having demonstrated: good robustness; linearity in the concentration range of 0,02 to 0,05 mg/mL with linear equation of $y = 132887304,980x + 127223,837$ and correlation coefficient of 0,999; good precision, being $RSD < 1,0\%$ for intra-day precision and $= 1,1\%$ for inter-day precision; average recuperation of 99,33%, what demonstrates accuracy; sensitivity, with quantification and detection limits of 0,08 and 0,25 μ L/mL, respectively. Three batches of apramycin soluble oral powder were analyzed by HPLC method and by the official microbiological method having the statistical comparison between the obtained results by T test demonstrated that there are no significant differences between both of them at $\alpha = 0,05$ level.

Key-words: Apramycin. CLAE. Turbidimetric Method. Derivatization. *o*-Phthalaldehyde

1 INTRODUÇÃO

Os aminoglicosídeos são uma classe grande e diversa de antibióticos caracterizados por possuírem aminoaçúcares unidos por ligações glicosídicas a um componente aminociclitol. Seu espectro de ação bactericida é amplo, principalmente contra os microrganismos Gram-negativos, porém, seu uso clínico é limitado devido aos efeitos colaterais de nefrotoxicidade e ototoxicidade, além do surgimento de cepas resistentes. Alguns aminoglicosídeos são utilizados na medicina veterinária para tratamento de infecções bacterianas ou na sua profilaxia e, entre os fármacos de escolha para tal, encontra-se a apramicina, da qual trata este trabalho.^[1]

A apramicina (formalmente chamada nebramicina fator 2) é um aminoglicosídeo produzido por uma cepa de *Streptomyces tenebrarius*, com estrutura molecular complexa, cujo mecanismo de ação baseia-se, como os demais membros de sua classe, na inibição da síntese protéica bacteriana, sendo o efeito primário a inibição da translocação. É empregada somente na medicina veterinária para o tratamento de colibacilose, enterite bacteriana e salmonelose em aves domésticas, bezerros e principalmente em porcos e leitões jovens; encontra-se disponível nas formas injetável, premix e pó oral solúvel.^[2,3]

Os antibióticos são freqüentemente empregados na medicina veterinária seja no tratamento de rebanhos ou de animais de forma individual com finalidades curativas, profiláticas ou até mesmo promotoras de crescimento. Entretanto, uma consequência indesejada de tal prática é a possível ocorrência de resíduos em tecidos do animal, que pode ser devida à condução incorreta do tratamento, suplementação incorreta de alimentos ou uso de fármacos em quantidades acima das permitidas. Essa situação pode se constituir em aspecto de preocupação quando se considera que muitos animais tratados são destinados ao abate para consumo humano e que sua carne pode conter resíduos em níveis acima dos permitidos pela legislação.^[4,5,6]

No caso da apramicina a ocorrência de tal situação pode se tornar crítica quando se considera que, por ser um membro da família dos aminoglicosídeos, também apresenta a nefrotoxicidade e a ototoxicidade como efeitos colaterais indesejados. Além das análises de resíduos em alimentos de origem animal, torna-se necessário um controle rigoroso do seu teor nas formas farmacêuticas empregadas. Isto requer o uso de métodos analíticos adequados que assegurem a eficácia bem como a segurança dos produtos, principalmente no que se refere à potência e pureza do princípio ativo.^[56,98]

O único compêndio oficial que traz as monografias referentes à matéria-prima e às apresentações disponíveis para a apramicina é a Farmacopéia Britânica, no suplemento veterinário, a qual recomenda o doseamento microbiológico por turbidimetria para determinação do teor de apramicina.^[8]

Os ensaios microbiológicos têm sido usados historicamente não só para determinação do teor de aminoglicosídeos, mas também de vários outros antibióticos, pois através deles se consegue demonstrar sua atividade ou potência biológica. Esta característica é obtida comparando-se a inibição do crescimento de um microrganismo sensível ocasionada por concentrações conhecidas do antibiótico sob avaliação frente a uma substância química de referência. Este é o princípio dos métodos mais utilizados como a difusão em ágar e o método turbidimétrico.^[1,9]

No ensaio turbidimétrico emprega-se uma série de tubos que contêm concentrações próximas do antibiótico, além do meio de cultura líquido e do microrganismo-teste; o efeito inibitório do antibiótico caracteriza-se pela redução gradual do crescimento microbiano, de modo que os dados da leitura turbidimétrica originados após incubação permitem a construção de uma curva que relaciona a concentração do antibiótico com a turbidez resultante. Apresenta boa precisão e menor período de incubação comparado a outros métodos microbiológicos, mas também pode estar sujeito a interferências provenientes de constituintes da amostra e variações no tempo e na temperatura de incubação.^[9, 10]

Embora os métodos microbiológicos sejam ainda os métodos de escolha na determinação da potência de vários antibióticos, como é o caso da apramicina, tratam-se de técnica trabalhosa, demorada, com precisão e exatidão reduzidas quando comparados aos métodos físico-químicos, cujo uso vem se tornando crescente.^[7] Além disso, no caso de antibióticos que se constituem de uma mistura de compostos relacionados, ou ainda no caso daqueles que, mesmo sendo substâncias distintas, pertencem a uma mesma classe e são estruturalmente semelhantes, torna-se salutar o emprego de um método físico-químico não só para quantificar, mas principalmente para assegurar a identidade da substância, a proporção de cada composto (no caso de misturas), bem como a presença ou não de produtos de degradação ou outras impurezas. Desta forma, muitos métodos físico-químicos acabaram se constituindo em métodos oficiais para muitos antibióticos e, dentre os mais empregados destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).^[11,12,13]

A cromatografia líquida de alta eficiência proporciona seletividade e eficiência melhoradas na separação, sensibilidade realçada na detecção, precisão e reprodutibilidade na análise de fármacos durante a pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade, o que justifica que seja o método de escolha para identificação, doseamento, determinação de impurezas e produtos de degradação, substituindo, assim, muitos métodos físico-químicos clássicos de análise de fármacos já existentes. ^[14]

Torna-se, portanto, interessante e viável o desenvolvimento de um método alternativo para análise de apramicina que reúna a sensibilidade, exatidão e rapidez da cromatografia líquida de alta eficiência. Contudo, há que se assegurar e confirmar que o novo método será adequado à finalidade pretendida através de sua validação. Além disso, como se trata de um antibiótico, é necessário correlacionar o novo método com o método microbiológico oficial já existente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antibióticos aminoglicosídeos – considerações gerais

Os antibióticos aminoglicosídeos são uma classe de antibióticos cujos compostos caracterizam-se por conterem dois ou mais aminoaçúcares unidos por uma ligação glicosídica ao núcleo de hexose, que geralmente se encontra em posição central, também chamado de aminociclitol. Os aminoglicosídeos terapeuticamente usados contêm geralmente 1,3 ou 1,4-diaminociclitol.^[15]

Eles são compostos orgânicos de baixa massa molecular, hidrossolúveis, polares e básicos com uma pKa entre 7,5 e 8. São geralmente utilizados na forma de sulfato e geralmente se apresentam como um pó branco ou amarelado; este pó é amorfo, inodoro, hidrossolúvel e levemente amargo.^[16]

Os aminoglicosídeos são divididos em dois grupos de acordo com o aminociclitol: estreptamina e 2-desoxistreptamina. O grupo desoxistreptamina, o maior, é também dividido em 2 subgrupos de acordo com o número e a posição dos substituintes no núcleo desoxistreptamina. Os subgrupos mais conhecidos e caracterizados são (1) neomicinas e paromomicinas, no qual os substituintes estão em posições adjacentes (posições 4 e 5) e (2) gentamicinas e canamicinas, no qual os substituintes estão em posições não-adjacentes (posições 4 e 6) do núcleo aminociclitol. O grupo da estreptamina contém estreptomicina e dihidroestreptomicina.^[7,16]

Há alguns autores que consideram ainda a existência de um terceiro grupo na classificação dos aminoglicosídeos, o dos aminociclitóis. Os aminociclitóis são compostos relacionados aos aminoglicosídeos. Enquanto os aminoglicosídeos contêm aminoaçúcares unidos por uma ligação glicosídica, os aminociclitóis têm um grupo amino no anel ciclitol. Os dois representantes principais deste grupo são a espectinomomicina e a apramicina, fármaco de interesse do presente trabalho.^[6]

Os antibióticos aminoglicosídeos são produzidos por fungos do gênero *Streptomyces* e *Micronospora*. Amplamente utilizados na medicina veterinária e humana, estes antibióticos de

amplo espectro são efetivos contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Salmonella* e infecções por enterobactérias. A gentamicina e a amicacina também são efetivas contra as espécies de *Pseudomonas*.^[17]:

O primeiro aminoglicosídeo, estreptomicina, foi identificado em 1944 durante a pesquisa de compostos hidrossolúveis e estáveis contra bactérias gram-negativas; é utilizado até hoje no tratamento da tuberculose. A canamicina foi isolada em 1957, contra as bactérias resistentes à estreptomicina. Subseqüentemente, as bactérias resistentes à canamicina foram isoladas e, uma vez entendido o mecanismo da resistência, começaram a ser sintetizados os aminoglicosídeos semi-sintéticos, tais como a amicacina e a netilmicina.^[7]:

Os aminoglicosídeos são agentes bactericidas rápidos, agindo particularmente contra as bactérias aeróbicas gram-negativas. Eles são fracamente ativos ou inativos contra anaeróbicos, estreptococos e pneumococos. Sua combinação com beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e antibióticos polipeptídicos é sinérgica. A sua atividade bactericida é usualmente dependente da concentração: quanto maior a concentração, maior a taxa de destruição das bactérias. Caracterizam-se também por apresentarem efeito pós-antibiótico, que é a persistência de uma atividade bactericida residual após a queda da concentração sérica abaixo da concentração inibitória mínima. Considerando-se essas propriedades combinadas à sua toxicidade, tem-se a justificativa para a eficácia dos esquemas de dose única diária dos aminoglicosídeos^[15,16]

O seu modo de ação consiste principalmente na inibição da síntese protéica e redução da fidelidade de tradução do mRNA no ribossomo bacteriano. A resistência microbiana, geralmente mediada e transferida por plasmídios, relaciona-se à sua inativação por enzimas microbianas específicas e vem se tornando um problema crescente nesta classe de antibióticos.^[15,16]:

A farmacocinética entre os diferentes membros da classe é comparável: nenhuma absorção no tubo digestivo, fraca ou inexistente ligação protéica no plasma, meias-vidas de eliminação similares (2 a 3 hs), não atravessam a barreira hematencefálica, podem penetrar o humor vítreo ocular ou atingir concentrações elevadas dos líquidos articular e pleural. São eliminados essencialmente na forma ativa (50 a 60% da dose), não metabolizada por filtração glomerular associada à reabsorção tubular.^[16]:

Todos os membros do grupo compartilham do mesmo espectro de toxicidade, sendo esta a principal preocupação na terapia com aminoglicosídeos. Como eles são cátions polibásicos, têm

a tendência de se ligar fortemente aos fosfolipídios ácidos, encontrados nos rins e nos tecidos cocleares, o que favorece o seu acúmulo nestas regiões e os caracteriza, portanto, como sendo nefro e ototóxicos. [7,16]

De acordo com o trabalho publicado por SILVA^[18] et al., os mecanismos de toxicidade não estão muito bem definidos embora seja sabido que os aminoglicosídeos tendem a se acumular nas células do córtex renal causando mudanças estruturais e funcionais da membrana plasmática, mitocôndria e lisossomos, danificando, por fim, os túbulos proximais. Entretanto, como a nefro-toxicidade é dose-dependente, pode ser revertida com a interrupção do tratamento. A ototoxicidade é o efeito colateral de maior preocupação, pois, conforme o fenótipo do paciente ou uso extensivo, pode haver indução de toxicidade crônica, com surdez irreversível e distúrbios no equilíbrio devido à disfunção coclear e prejuízos ao vestibulo. Conforme testes realizados em culturas de células cocleares, verificou-se que a neomicina produziu o maior dano, seguida da gentamicina, dihidroestreptomicina, amicacina, neamina e espectinomicina.

Devido a estes sérios efeitos tóxicos decorrentes da terapia com antibióticos aminoglicosídeos, torna-se necessário o monitoramento das concentrações séricas para adaptação das doses, sobretudo em pacientes com insuficiência renal, já que há uma margem estreita entre a dose terapêutica e a dose tóxica. [7]

2.2 Apramicina

2.2.1 Características estruturais e químicas

Conforme já anteriormente citado, a apramicina é um antibiótico aminoglicosídeo pertencente ao grupo dos aminociclitóis, produzida pelo *Streptomyces tenebrarius*. A apramicina é, na verdade, um composto derivado da nebramicina, um antibiótico complexo também produzido pela mesma cepa de microrganismo, cujo primeiro relato se deu em 1968 por Stark, Hoehn & Knox; por esse motivo a apramicina também é chamada de nebramicina fator-2. [3, 19, 20, 21]

A tobramicina, outro aminoglicosídeo, também é derivada do complexo da nebramicina e é chamada de nebramicina fator 6. Quando se descobriu a apramicina, acreditava-se que sua estrutura fosse bastante similar à da tobramicina e demais antibióticos do grupo da canamicina, apresentando uma desoxistreptamina 4,6-dissubstituída, mas logo após as diferenças foram evidenciadas.^[3, 19,20,21]

O'CONNOR^[19] e colaboradores fizeram um exame detalhado da estrutura da apramicina, envolvendo análises degradativas, sintéticas e espectroscopias, e verificaram que a mesma possui uma estrutura incomum, sendo suas principais características a presença de um núcleo 4-amino-4-deoxi-D-glucose, uma ligação glicosídica 1-1' e uma octadiose que forma um rígido sistema bicíclico. A estrutura proposta foi confirmada por estudo de difração com raio X e pode ser vista na Figura 1 abaixo.

Fonte: O'Connor et al., 1976

Figura 1. Estrutura química da apramicina

A presença de um açúcar bicíclico pirano-piranos e uma desoxiestreptamina monossubstituída tornam a apramicina um aminoglicosídeo de estrutura única. De acordo com HERMANN^[22], além da estrutura diferenciada, a apramicina difere dos demais aminoglicosídeos em outros aspectos: apresenta substituição glicosídica da 2-desoxiestreptamina somente na posição 4 enquanto nos demais membros do grupo o sítio de ligação decodificador (responsável

pela atividade antibacteriana) pode apresentar modelos de diss substituição nas posições 4 e 5 ou ainda nas posições 4 e 6; seu efeito primário é inibir a elongação da cadeia protéica pelo bloqueio da translocação ribossômica, em contraste com os aminoglicosídeos com 2-desoxiestreptamina diss substituídos, os quais induzem a erros durante a translocação; diferente da maioria dos outros aminoglicosídeos, a apramicina se liga com afinidades similares no sítio de decodificação de RNA das células bacterianas e também das eucarióticas (humanas).

A apramicina não possui resistência cruzada com outros antibióticos da mesma família. Esta situação pode ser também devida à sua estrutura incomum, o que dificulta sua inativação por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, embora já se tenha conhecimento de uma acetiltransferase para a qual a apramicina é um substrato. ^[3,20]

Como os demais membros da família dos aminoglicosídeos, a apramicina é um composto polar, hidrofílico, pouco solúvel em álcool, insolúvel em acetona e éter, não-volátil; também não possui grupos cromóforos em sua estrutura. O sulfato de apramicina, forma sob a qual é empregada na terapêutica veterinária, é um pó amarelado e amorfo. ^[23]

2.2.2 Mecanismo de ação

Conforme já citado anteriormente, a apramicina é um inibidor extremamente potente da síntese protéica bacteriana tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sendo que o seu efeito primário consiste no bloqueio da translocação, ou seja, na inibição da elongação da cadeia protéica, sendo aparente mesmo em baixas concentrações do fármaco. ^[22] Além disso, no trabalho realizado por PERZYNSKI ^[3] e colaboradores também se observou que a apramicina induz a erro de leitura irreversível *in vitro* durante a translação, sendo este efeito proporcional à concentração do fármaco.

2.2.3 Farmacologia

Assim como os demais membros da família dos aminoglicosídeos, a apramicina também não é absorvida no trato gastrointestinal, tem baixa ligação às proteínas plasmáticas e é também eliminada quase que na forma inalterada pelas fezes e, em maior proporção, pela filtração glomerular. Entretanto, estudos realizados com radiomarcadores sobre o metabolismo da apramicina mostraram que, nos porcos, há uma tendência do acúmulo de apramicina no rim e que esta vai sendo eliminada lentamente. Percebe-se, portanto, que a apramicina também apresenta a nefrotoxicidade como efeito indesejável do seu uso e isso se constitui em aspecto de preocupação não só para o tratamento do gado mas, sobretudo, quando se considera que o mesmo será destinado ao abate e consumo humano e que poderá conter resíduos do fármaco. ^[24]

2.2.4 Uso terapêutico

Ao contrário de outros fármacos aminoglicosídeos, como a gentamicina, neomicina, dihidroestreptomicina e estreptomicina, a apramicina é empregada somente na medicina veterinária sob a forma de injeção, premix ou ainda como pó oral solúvel contra infecções causadas por microrganismos gram-negativos. Também pode ser usada com finalidade profilática e promotora do crescimento, embora esta última aplicação seja proibida em alguns países. A forma farmacêutica premix é destinada para mistura em rações, enquanto o pó oral solúvel é dissolvido na água potável de bebida do animal. ^[4,24,25,26]

É utilizada no tratamento de colisepticemia causada por cepas sensíveis de *Escherichia coli* e salmoneloses causadas por *Salmonella sp.* em aves domésticas. Nesses casos, deve-se administrar uma dosagem diária de 40 a 80 mg de atividade de apramicina/kg de peso corporal, durante 5 dias consecutivos. ^[24,25,26]

A principal indicação da apramicina é para o tratamento de colibacilose porcina, um tipo de diarreia causada por *Escherichia coli* que acomete principalmente os leitões que acabaram de ser desmamados; a disenteria suína causada por cepas sensíveis de *Brachyspira hyodysenteriae*

também pode ser tratada com apramicina. No caso de leitões desmamados, deve ser administrada uma dosagem diária de 12,5 mg de atividade de apramicina/ kg de peso corpóreo, durante 7 dias consecutivos. Para leitões recém-nascidos, a dose diária deve ser de 25 mg de atividade de apramicina/kg de peso corporal durante os 3 primeiros dias de vida. [24,25,26]

A apramicina também é utilizada no gado bovino para o tratamento de colibacilose, salmonelose e enterite bacteriana causadas por cepas sensíveis de *Escherichia coli* e *Salmonella sp* em bezerros. Para estes casos, deve-se administrar 40 mg de atividade de apramicina/kg de peso corporal como tratamento curativo, ou, uma dosagem diária de 10 mg de atividade de apramicina/kg de peso corporal como tratamento preventivo, durante 5 dias consecutivos. [24,25,26]

Em todos esses casos o tratamento deve ser suspenso 28 dias antes do abate dos animais para consumo humano. A apramicina não pode ser utilizada em gatos, pois é tóxica a estes e também não pode ser usada em animais que produzam leite ou ovos para consumo humano. [24,25,26,27]

2.2.5 Impacto ambiental

De acordo com os registros do fármaco na FDA, os ambientes que podem ser afetados por possíveis resíduos do fármaco são o locais de produção do fármaco enquanto matéria-prima, produção e embalagem do produto acabado e as fazendas onde o gado é tratado. [24]

A apramicina é introduzida no meio ambiente primeiramente pelas fezes dos animais tratados; quantidades pequenas serão expelidas na urina. Um estudo com apramicina marcada com C¹⁴ em porcos mostrou que ela é excretada praticamente na forma inalterada, o que indica que sofre pouca metabolização. [24]

Dessa forma, numa hipótese de pior condição, a apramicina poderia se acumular em solos que recebam constantemente esterco de animais tratados, mas, mesmo assim, foi demonstrado através de diversos estudos feitos antes do registro do medicamento, que não há risco de contaminação severa para o meio ambiente, incluindo outros animais, a água e o próprio homem, uma vez que, enquanto presente no solo, a apramicina fica aderida a este, devido às suas propriedades físico-químicas. Pouca transformação da mesma, se alguma, irá ocorrer. [24]

No entanto, o seu uso no tratamento de animais cuja carne é destinada ao consumo humano pode resultar na ocorrência indesejada de resíduos de apramicina em níveis acima dos permitidos nos alimentos de origem desses animais. [4, 27]

A presença de resíduos pode resultar da falta de aderência ao tempo correto de retirada do medicamento, uso ilegal do medicamento, uso do fármaco em quantidades acima das permitidas, contaminação dos alimentos, suplementação incorreta de alimentos, entre outros. A ocorrência de resíduos, não só de apramicina, mas também de outros aminoglicosídeos e outras classes de antibióticos têm sido aspecto de preocupação e, com a finalidade de monitorá-los, diversos programas de vigilância têm sido implantados em diversos países. [4]

No caso específico dos aminoglicosídeos, e, por conseguinte, da apramicina, essa situação pode se agravar quando se considera a sua toxicidade; portanto, torna-se também necessário um controle rigoroso das preparações farmacêuticas empregadas no uso veterinário, principalmente quanto à potência do antibiótico, para garantir sua eficácia e segurança. Para tanto, há que se recorrer a métodos analíticos adequados que permitam a detecção e quantificação da apramicina com rapidez, precisão e exatidão.

2.3 Métodos de determinação de apramicina

2.3.1 Ensaio microbiológico turbidimétrico

O ensaio microbiológico turbidimétrico é a metodologia oficial para determinação do conteúdo de apramicina na matéria-prima e nas apresentações farmacêuticas disponíveis, injetável, pó oral solúvel e premix, descrito pela Farmacopéia Britânica (BP), único compêndio que traz monografias referentes à apramicina. [8, 28] O método proposto recomenda o emprego *Salmonella choleraesuis* como inóculo, temperatura de incubação de 37°C e sulfato de apramicina como substância padrão de referência. Também é recomendado o uso do tampão fosfato pH 8,0 como diluente das amostras e do padrão e o meio de cultura composto por dextrose, triptona e extrato de levedura. [28]

A determinação da potência de um antibiótico através de um método microbiológico baseia-se no seu efeito inibitório sobre o crescimento de microrganismos sensíveis, em condições adequadas. Através da comparação entre o efeito causado por uma substância padrão de referência e por essa mesma substância contida em uma amostra que se deseja analisar, é possível obter a potência do antibiótico em questão. Este se constitui o princípio dos métodos de doseamento microbiológico mais empregados, como o difusão em ágar e o turbidimétrico, método de interesse no presente caso.^[9, 10]

O método turbidimétrico caracteriza-se por séries de tubos contendo concentrações muito próximas do antibiótico, além do meio de cultura líquido e do microrganismo-teste. Após o período de incubação, efetua-se a leitura turbidimétrica de cada tubo e os dados obtidos permitem a construção de curva que relaciona a concentração do antibiótico com a turbidez resultante.^[9,10,29,30]

A resposta fornecida pelo método pode ser dimensionada como peso seco, número total de microrganismos, número de microrganismos viáveis, nitrogênio total, pH, acidez titulável, liberação de CO₂, consumo de oxigênio. Entretanto, a leitura de turbidez é o parâmetro mais empregado, seja para respostas a antibióticos ou vitaminas.^[9,30]

O primeiro método turbidimétrico considerado preciso foi descrito por FOSTER^[31] em 1942 e tratava-se de um procedimento para o ensaio de penicilina empregando *Staphylococcus aureus*, cepa Oxford, em caldo nutriente. Realizou-se o ensaio com quantidades crescentes de penicilina que produziram inibição do crescimento do microrganismo proporcionalmente à concentração, permitindo realizar determinações quantitativas. O procedimento envolveu a comparação em paralelo quanto à inibição de crescimento microbiano de várias diluições da amostra desconhecida com várias diluições do padrão. O período de incubação inicial era de 16 horas e foi posteriormente reduzido para 4 horas. Considerava-se um método tedioso e trabalhoso, pouco empregado na época.

Posteriormente, McMAHAN^[32] apresentou um procedimento semelhante ao de FOSTER, mas com 3 a 4 horas de incubação. As variáveis envolvidas no teste foram estudadas e, através de um estudo comparativo, concluiu-se que os resultados apresentavam precisão satisfatória em relação aos testes de diluição em tubos e difusão em gel, bem como custo reduzido. Variações no

perfil da curva dose-resposta também foram relatadas, o que evidenciava a necessidade de emprego cuidadoso desta metodologia.

Com o passar do tempo, começaram a surgir trabalhos propondo técnicas para se otimizar os tempo de incubação. Um método turbidimétrico com possibilidade de leitura em cerca de 3 a 4 horas foi proposto por RAKE e JONES^[33], utilizando estreptococos como microrganismo-teste. LEE^[34] e colaboradores obtiveram resultado em tempo de incubação de 90 minutos, empregando cepa de estreptococos do grupo B de Lancefield, que apresentou adequada exatidão para determinação de penicilina. Neste trabalho o autor recomendou o emprego de formol para cessar o crescimento microbiano bem como evitar a variação de turbidez que poderia ocorrer durante a etapa de leitura.

Os resultados experimentais a respeito dos fatores que influenciam a exatidão do método turbidimétrico foram relatados primeiramente por BOND e DAVIES^[35], em 1948. Neste trabalho utilizaram *Staphylococcus aureus* cepa Oxford NCTC 6571 e cepa NRRL 313 de origem americana e propuseram metodologia empregando 3 concentrações do padrão e da amostra. Relacionando-se a medida da turbidez e o logaritmo da concentração do antibiótico, obteve-se uma resposta linear tanto para os padrões como para as amostras, cujas retas eram paralelas. Os autores destacaram algumas vantagens do método turbidimétrico, como o emprego de uma mesma série de padrão para amostras ensaiadas simultaneamente, além de tempo de incubação de no máximo, 4 horas, tornando dispensável a esterilidade das soluções-teste.

Tendo por finalidade desenvolver método adequado para determinação da potência de antibióticos em preparações analíticas, JOSLYN e GALBRAITH^[36] estudaram curvas de crescimento de várias bactérias patogênicas em diversas condições experimentais. No início do estudo, os resultados mostraram que após um período de incubação de 4 horas atinge-se um máximo de crescimento e logo após começa o decaimento. Entretanto, na presença de antibiótico o crescimento foi alterado de maneira regular com concentrações crescentes da substância antimicrobiana e de maneira menos ordenada quando a concentração da substância antimicrobiana era elevada. Em prosseguimento ao estudo foi determinada vantagem da supressão da fase *lag* de crescimento, empregando um inóculo jovem. Determinou-se como ponto final do ensaio o ponto onde o crescimento microbiano era inibido em 50% em relação ao tubo controle.

Extensa revisão para o método turbidimétrico de determinação de antibióticos e vitaminas foi publicada por GAVIN^[37]. Nela, o ensaio turbidimétrico foi classificado em 2 categorias: a primeira envolvia resposta do tipo tudo ou nada, qualitativa, e a segunda categoria, uma resposta gradual, um método quantitativo. Os fatores influenciando o método turbidimétrico e os procedimentos de leitura da turbidez foram relatados juntamente com estudos da precisão dos resultados, evidenciando limites de erro que variaram de 2% a 20%.

Outra revisão foi publicada no mesmo período por LOY e WRIGHT^[38], em 1959, incluindo também vantagens e desvantagens do ensaio turbidimétrico. Todas as etapas de desenvolvimento e aplicação da metodologia foram abordadas no referido estudo. Procedimentos referentes ao uso adequado de padrões de referência, microrganismos, meios de cultura, preparação da solução-teste (englobando também a preparação dos tubos), a medida da resposta do teste a fim de se obter respostas precisas e uniformes foram discutidos. Foi destacada pelo autor a necessidade da utilização do padrão de referência puro, microrganismo sensível à substância a ser testada, meio de cultura de composição conhecida, preparo de amostras com precisão e em condições de liberar o princípio ativo, eliminação dos interferentes, preparação cuidadosa dos tubos de ensaio e medição da resposta com precisão através de métodos exatos.

O método turbidimétrico foi validado por RIPPERE^[39], que obteve linearidade na faixa de absorvância de 0,4 a 1,2. A exatidão e a precisão do método em relação ao da difusão em gel foram destacadas. Para a medida do crescimento microbiano estabeleceu-se a importância do uso de um espectrofotômetro adequado para assegurar medidas exatas.

O ensaio turbidimétrico apresenta como vantagens sobre os demais métodos microbiológicos a rapidez, facilidade operacional, medida objetiva da resposta, ausência de efeitos de difusão e exatidão. No entanto, há vários fatores que podem interferir na execução do método e, portanto, afetar o resultado final, tais como: presença de substâncias inibidoras provenientes da matriz da amostra, no caso de amostras de composição complexa; presença de nutrientes na amostra que acabam por enriquecer o meio de cultura e alteram a taxa de crescimento microbiano; limpeza insuficiente ou inadequada dos tubos, o que pode ocasionar a presença de resíduos (traços do detergente ou outras substâncias absorventes) que podem interferir na leitura; tempo de agitação do tubo antes da leitura, que deve ser suficiente para impedir retorno da sedimentação microbiana sem provocar incorporação de bolhas de ar; controle inadequado do tempo e da temperatura, uma vez que esses dois parâmetros são críticos,

principalmente a temperatura, que deve ser rigorosamente controlada e uniforme em todos os tubos; tamanho do inóculo e fase de crescimento da população microbiana. ^[9,10,30]

Assim como no caso da apramicina, outros membros da classe dos aminoglicosídeos também apresentam o ensaio microbiológico turbidimétrico ou o método de difusão em ágar como métodos oficiais para análise de matérias-primas e preparações farmacêuticas. Os métodos microbiológicos em geral são simples e baratos de executar; entretanto, em alguns casos, podem ser demorados, inespecíficos e deficientes em sensibilidade adequada. ^[1,17]:

Recentemente os métodos físico-químicos estão se destacando e se tornando uma interessante alternativa na análise dos antibióticos, especialmente os que empregam a cromatografia líquida de alta eficiência, por apresentar características como exatidão, sensibilidade, especificidade e, particularmente, devido à rapidez na obtenção dos resultados. ^[29]

De acordo com JOSHI, ^[40] o alto poder de resolução proporcionado pela técnica a torna uma ferramenta poderosa na avaliação da pureza de antibióticos, seja na forma de matéria-prima ou produto acabado, quanto à presença de substâncias relacionadas, produtos de degradação ou ainda impurezas decorrentes do processo produtivo ou ainda de substâncias relacionadas.

Embora os métodos físico-químicos possam, em alguns casos, ser suficientes, há situações nas quais um fármaco não pode ser definido e/ou quantificado em termos de suas propriedades químicas ou físico-químicas; então a alternativa óbvia é considerar suas propriedades biológicas e prevalecem, portanto, os métodos microbiológicos para determinação da potência. ^[10]

2.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

2.3.2.1 Generalidades sobre CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência (em português, CLAE; em inglês, HPLC) é um método físico-químico de separação fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis: a fase móvel e a

fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. ^[41,42,43]

Dentre todas as técnicas analíticas de separação, a cromatografia líquida de alta eficiência é a mais utilizada devido à sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria, para muitos campos da ciência e para o público. Na área farmacêutica, por exemplo, vem substituindo com sucesso diversos métodos espectrofotométricos de cromatografia a gás e até mesmo os microbiológicos nas análises de antibióticos, já que proporciona maior especificidade e rapidez. Diversas outras vantagens podem ainda ser citadas, como: sensibilidade, alta resolução, análises quantitativas de fácil execução e grande precisão, boa detectabilidade, tempo reduzido de análise, versatilidade, mecanização e adequação à separação de espécies não-voláteis ou termicamente frágeis, sendo esta última uma vantagem importante sobre a cromatografia a gás para análise de compostos orgânicos. ^[42,12]

Entretanto, como em toda técnica analítica, há também alguns inconvenientes e limitações do seu uso, tais como: alto custo de instrumentação e de operação; inexistência de um bom detector universal, necessidade de grande experiência do operador para se atingir o máximo de aproveitamento do sistema de CLAE e, portanto, maior tempo de treinamento. ^[42,12]

Conforme pode ser visto na Figura 2 a seguir os sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência são basicamente compostos pelas seguintes partes: reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel, sistema de introdução da amostra, sistema analítico (coluna cromatográfica e, em alguns casos, um termostato para controle da temperatura da coluna), sistema de detecção e sistema de registro e tratamento de dados. ^[43,41,45].

Fonte: <http://www.cefeteq.br/aluno/arquivos/apostilas/instrumental/CLAE.pdf>, 2008

Figura 2. Esquema simplificado dos componentes de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência

As bombas empregadas em CLAE impulsionam a fase móvel através de todo o sistema sob alta pressão (máximo 500 atm) com fluxos que vão de 0,01 até no máximo 5 mL/min (fins analíticos), que devem ser constantes e reprodutíveis. Há bombas que possuem apenas um canal e outras que possuem de dois a quatro canais, cada um podendo operar com um solvente diferente e, conforme o caso, simultaneamente, permitindo misturas e alterações da composição da fase móvel na própria bomba, tanto no modo isocrático (fase móvel com composição constante ao longo de toda a análise) quanto no modo por gradiente (composição da fase móvel vai se alterando gradualmente ao longo da análise).^[43, 45]

Após a sua solubilização na própria fase móvel ou em outro solvente apropriado, a amostra é introduzida no sistema cromatográfico, o que pode ser feito de forma manual, com seringa apropriada, ou por meio de um injetor ou amostrador automático. Este consiste em um

carrossel ou bandeja, capaz de acomodar diversos frascos contendo as amostras, podendo ser programado para injetar diversas quantidades e volumes das mesmas, além de outras operações como diluição, derivatização ou adição de reagentes. Para ambos os tipos de injetor necessita-se de uma válvula, que apresenta um sistema calibrado, com tubulações de volume preciso (alças de amostragem) que são preenchidas com a solução a ser analisada, que é posteriormente transferida à coluna. ^[41, 44]

A coluna é a parte principal do sistema analítico, onde se dá a separação dos componentes presentes na amostra. É constituída em tubo de material inerte, com diâmetro interno uniforme, resistente a altas pressões. O preenchimento geralmente é de sílica gel, seus derivados orgânicos ou ainda copolímeros termorrígidos e infusíveis, conforme o mecanismo da separação: partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações eletroquímicas; o diâmetro das partículas do recheio pode variar entre 3 a 10µm. O diâmetro interno das colunas de separação varia de 2 a 5 mm e o seu comprimento pode ir de 3 a 60 cm. Deve-se atentar que o diâmetro médio da fase estacionária, sua natureza, diâmetro e comprimento da coluna são importantes na eficiência da separação, tempo de análise e consumo de fase móvel. ^[41,42, 44]

Em alguns sistemas, há ainda um forno que permite aquecimento da coluna, com o objetivo de aumentar a eficiência das separações; entretanto, evita-se trabalhar acima de 60°C devido à volatilidade dos solventes da fase móvel e também por aumentar o potencial de degradação da fase estacionária devido ao calor. ^[41, 44,46]

Na maioria das análises farmacêuticas, a separação se dá por partição dos componentes da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária. Sistemas constituídos por fases estacionárias polares e fases móveis apolares são chamados de cromatografia em fase normal e o oposto, fase estacionária apolar e fase móvel polar, são denominados de cromatografia em fase reversa. No primeiro caso, o empacotamento da coluna é constituído por adsorventes orgânicos como a sílica ou a alumina, ou fases quimicamente ligadas, como os grupos amino, nitrilo ou diol; os solventes utilizados na fase móvel são não-polares como o éter etílico, clorofórmio e *n*-hexano, sendo que a retenção aumenta com o decréscimo da polaridade dos mesmos. ^[41, 42,44]

No caso da cromatografia de fase reversa, os empacotamentos têm caráter não-polar, como os grupos octil, octadecil e fenil. A fase móvel geralmente constitui-se de uma mistura de água e acetonitrila, sendo que esta última pode ser substituída por metanol ou tetrahidrofurano;

conforme o aumento de polaridade, aumenta o tempo de retenção do composto de interesse. Quando se analisa compostos iônicos, pode-se acrescentar à fase móvel algum ácido, base ou solução-tampão (numa escala de pH 2-8) para supressão da ionização, ou ainda um sal orgânico que seja capaz de formar um par de íons por associação (cromatografia de pareamento iônico).
[42,44]

O detector mede de forma contínua alguma propriedade física ou físico-química da amostra, ou da solução que a contém e envia um sinal para registro, proporcional à concentração do componente na amostra. Um bom detector deve possuir alta sensibilidade, alta seletividade, linearidade, baixo limite de detecção e estabilidade frente a mudanças na composição da fase móvel e na temperatura.^[41, 43, 45].

Os detectores espectrofotométricos UV-Visível são os mais utilizados em CLAE e o seu princípio de funcionamento envolve absorção da luz ultravioleta ou visível por parte da amostra quando sobre ele incide radiação eletromagnética. Há os de comprimento de onda fixo, que operam em um único comprimento de onda, e os de comprimento de onda variável, que permitem a escolha do comprimento de onda para cada análise, podendo emitir luz ultravioleta através de lâmpadas de deutério, ou ainda na região do visível, através de lâmpadas de tungstênio. Os detectores multi-comprimento de onda permitem a medida de absorbância em dois ou mais comprimentos de onda simultaneamente e neste grupo se encontram os detectores de arranjo de fotodiodos, que possibilitam uma “varredura” da região UV-Vis em uma única corrida, para medidas de pureza do pico e análise de amostras desconhecidas.^[41,42,44,46]

O princípio de funcionamento dos detectores de fluorescência é a emissão de energia fluorescente por um soluto excitado por radiação UV. É um detector seletivo para compostos que fluorescem ou que são convertidos em derivados fluorescentes. Apresenta maior sensibilidade e seletividade que o detector UV-Visível.^[41,42,44,46]

Os detectores de índice de refração medem a diferença no índice de refração da fase móvel e do eluente vindo da coluna. Trata-se de um detector não-seletivo, sensível a variações de temperatura, pressão, fluxo e composição da fase móvel. Apresenta baixa estabilidade, sendo inadequado para eluição em gradiente. É utilizado para compostos que não absorvem no UV e não fluorescem.^[41,42,44,46]

Há ainda os detectores potenciométricos, voltamétricos e eletroquímicos que se baseiam em interações eletroquímicas do analito com o eletrodo de trabalho. São seletivos para solutos iônicos, oxidáveis ou redutíveis e são sensíveis, seletivos e confiáveis, mas requerem o uso de fases móveis livres de oxigênio dissolvido e íons metálicos redutores, além de cuidado especial para que o pH, a temperatura e a força iônica da fase móvel permaneçam constantes.^[41,42,44,46]

Recentemente vem se tornando comum o uso do detector de espectrometria de massas, que, apesar do alto custo e de ser destrutivo, é extremamente seletivo e fornece a massa molecular, permitindo a elucidação estrutural do(s) composto(s) de interesse. É o detector ideal para estudos de bioequivalência.^[41]:

Outro detector que está sendo utilizado em pesquisas é o detector por espalhamento de luz (*light-scattering*), cujo princípio envolve a nebulização do eluente vindo da coluna em um aerossol, seguido de vaporização do solvente para produzir pequenas partículas a serem detectadas em uma cela de espalhamento de luz. A intensidade da luz espalhada depende do tamanho das partículas formadas no tubo de aquecimento que, por sua vez, depende do tamanho das gotículas formadas durante o processo de nebulização. A interação da luz com a partícula dependerá de seu tamanho, forma e propriedades superficiais. É um detector não-seletivo, destrutivo.^[41]

Os dados gerados pelo sistema cromatográfico podem ser registrados por um registrador, um integrador ou um microcomputador, através de softwares específicos. Atualmente, este último tem sido mais utilizado porque aumenta a versatilidade, a exatidão e a precisão da CLAE, já que o microcomputador é usado tanto para processar e armazenar os dados fornecidos pelo detector, como para controlar todas as outras partes do sistema, o que permite monitoramento contínuo e diagnostica problemas.^[44,46]

2.3.2.2 A CLAE na Análise de Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são um grupo heterogêneo de antibióticos caracterizado por um largo espectro de atividade e toxicidade e, devido a esta última, considerável esforço tem sido atribuído à análise de seu conteúdo, seja em preparações farmacêuticas, seja no soro ou urina durante seu monitoramento terapêutico ou ainda no controle de seus resíduos em tecidos animais destinados ao consumo humano. Para que essa tarefa possa ser cumprida com êxito, os métodos utilizados devem ser precisos, exatos, sensíveis e robustos. Contudo, as suas características químicas de alta polaridade, hidrossolubilidade, baixa volatilidade e ausência de grupos cromóforos ou fluoróforos dificultam o desenvolvimento de métodos aplicáveis. ^[1,7]

Devido à sua alta especificidade, sensibilidade e exatidão, a cromatografia líquida de alta eficiência já vem sendo empregada com sucesso nas determinações de aminoglicosídeos, seja em análises de resíduos de fármaco(s) em alimentos de origem animal, em análises quantitativas de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas provenientes de monitoramento terapêutico, bem como em estudos de estabilidade e também no doseamento de aminoglicosídeos em preparações farmacêuticas. ^[1,7]

Os aminoglicosídeos são cátions polibásicos e, portanto, podem ser separados em colunas de troca iônica ou, o que é mais comum, por fase reversa com colunas C₁₈, com a técnica de pareamento iônico utilizando-se reagentes de pareamento iônico tipo alquilssulfonato. A técnica de fase reversa com pareamento iônico é a mais utilizada e geralmente preferida em relação à troca iônica, pois proporciona maior eficiência, maior facilidade de controle sobre a seletividade e a resolução e também maior estabilidade e reprodutibilidade do sistema cromatográfico. ^[1,47]

A ausência de grupos cromóforos ou fluoróforos na estrutura dos aminoglicosídeos torna necessário o emprego de reagentes de derivatização pré ou pós-coluna, que proporcionem detecção por UV ou fluorescência, dependendo do reagente utilizado. ^[1,7]

Segundo SNYDER^[48], a técnica de derivatização consiste numa reação química entre o analito de interesse e um reagente com capacidade de mudar suas propriedades físicas e químicas. Este tratamento tem a finalidade de reduzir a polaridade das espécies de modo que se possa usar a partição em vez da adsorção ou colunas de troca iônica; para aumentar a resposta do

detector e, portanto, a sensibilidade para todos os componentes da amostra e/ou ainda aumentar seletivamente a resposta do detector a certos componentes da amostra.^[48,12]

A primeira consideração ao se escolher a técnica de derivatização para aumentar a detecção é escolher o tipo de detecção para o analito em questão e, portanto, qual será o reagente empregado para tal. Os principais itens a serem considerados na escolha do reagente de derivatização são: sua estabilidade; facilidade de reação com o analito nas condições da análise; baixa toxicidade; tanto o reagente quanto os possíveis produtos secundários formados não devem interferir na detecção do analito e devem ser de fácil separação do mesmo; o procedimento escolhido deverá ser adaptável à automatização.^[48]

Os dois tipos mais comuns de reagentes de derivatização são os que proporcionam detecção UV e os que proporcionam a detecção por fluorescência. No primeiro caso, o reagente de derivatização deverá ter dois grupos funcionais, um que reaja com o composto de interesse e o outro, um cromóforo, que proporcione a detecção por UV; já no segundo caso, o reagente deverá possuir, além do grupo responsável pela reação com o composto em questão, um grupo fluoróforo capaz de gerar fluorescência intensa. Alguns reagentes utilizados para a derivatização de aminoglicosídeos são o *o*-ftalaldeído (OPA), o 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (FDNB), o ácido 2,4,6-trinitrobenzeno-1-sulfônico (TNBS) e o 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC-Cl); o mais utilizado de todos é o OPA que, entre outras vantagens, possui baixo custo e pode ser usado tanto para detecção por UV quanto por fluorescência.^[1,7,47,48,49,50]

A derivatização pode ser feita antes (pré-coluna) ou após (pós-coluna) a separação cromatográfica. Embora a derivatização pós-coluna seja adequada, ela requer um aparato apropriado entre o injetor e o detector no qual se dá a reação, o que aumenta tanto a complexidade do sistema cromatográfico, quanto o custo da análise. Já as técnicas de derivatização pré-coluna oferecem maior eficiência e sensibilidade que a pós-coluna, sem a necessidade de um aparato adicional.^[48]

O desenvolvimento contínuo da CLAE como uma técnica analítica resultou numa ampla faixa de colunas de diferentes fabricantes exibindo seletividades diversas. As separações utilizando tipos diversificados de colunas se combinaram com os vários sistemas de detecção resultando na publicação de um grande número de métodos para análise de aminoglicosídeos. Alguns exemplos importantes encontrados na literatura são citados a seguir.

A técnica de fase reversa com pareamento iônico e derivatização pós-coluna já foi empregada com sucesso na determinação de aminoglicosídeos no soro (ANHALT e BROWN^[49]) e em formulações farmacêuticas (FABRE^[50] e colaboradores), bem como na determinação de neomicina no plasma e na urina por SHAIKH, JAKSON e GUYER^[51], determinação de amicacina no plasma humano por WICHERT, SCHREIER e DERENDORF^[52]; OLSON^[53] e colaboradores também empregaram a mesma técnica para validar um método de análise para sulfato de paromomicina em preparações farmacêuticas. Todos esses métodos empregaram derivatização com OPA e 2-mercaptoetanol e detecção por fluorescência.

Conforme já citado anteriormente, a derivatização pré-coluna é mais vantajosa em termos de simplicidade e sensibilidade que a derivatização pós-coluna e tem sido usada com êxito por diversos autores, juntamente com CLAE em fase reversa e pareamento iônico. ZHOU^[54] et al. desenvolveram um método de determinação de canamicina A em alimentos de origem animal com extração em fase sólida; SOUZA e OGILVIE^[55]: fizeram a determinação dos componentes C_{1a}, C₂ e C₁ da gentamicina no plasma e na urina e. Estes dois trabalhos são exemplos de métodos que empregam derivatização com OPA em presença de 2-mercaptoetanol e detecção por fluorescência.

Há diversos métodos descritos, sobretudo para a análise de gentamicina, que também empregam cromatografia de fase reversa com pareamento iônico e derivatização com OPA, mas a mesma é feita em presença de ácido mercaptoacético, o que permite que a detecção seja feita por UV, como foi o caso dos trabalhos de WEIGAND e COOMBES^[56], CHISSELL^[57] e colaboradores, ALBRACHT e DE WIT^[58] e CLAES^[59] e colaboradores. Em todos esses casos os métodos propostos destinam-se à análise do teor de gentamicina em matérias-primas e produto acabado.

Outros autores, ainda se utilizando cromatografia em fase reversa e pareamento iônico com derivatização pré-coluna com OPA, desenvolveram métodos automatizados, tais como ESSERS,^[60] para determinação de aminoglicosídeos no soro, LAI e SHEEHAN^[61], no desenvolvimento de método com detecção simultânea em UV e fluorescência para determinação de tobramicina com sensibilidade e seletividade melhoradas, e CATURLA^[62] et al. em método para determinação de amicacina com detecção UV em formulações farmacêuticas de um estudo de estabilidade;

Além dos métodos que utilizam o OPA, há também vários métodos publicados nos quais foram utilizados outros reagentes de derivatização. É o caso da determinação de amicacina no soro feita por KABRA, BHATNAGER e NELSON^[63] e do método de determinação e separação de análogos de aminoglicosídeos proposto por GAMBARDELLA^[64] e colaboradores, ambos empregando derivatização pré-coluna com ácido 2,4,6-trinitrobenzeno-1-sulfônico. O reagente 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno foi utilizado na microdeterminação de tobramicina no soro por BARENDs, ZWAAN e HULSHOFF^[65] e na determinação de gentamicinas C₁, C_{1a} e C₂ no plasma e na urina por ISOHERRANEN e SOBACK^[66]. O trabalho de POSYNIK, ZMUDZKI e NIEDZIELSKA^[67] de preparação de amostras de tecidos animais para determinação de resíduos de gentamicina e neomicina, bem como a determinação de vertilmicina no plasma de ratos por LIU^[68] e colaboradores foram ambos realizados com derivatização por 9-fluorenilmetilcloroformato (Fmoc-Cl). Em 2003, o fenilisocianato foi outro reagente empregado com derivatização pré-coluna na análise de canamicina, neomicina e gentamicina em trabalho publicado por KIM^[11] et al..

Além da detecção UV e por fluorescência proporcionadas pela derivatização, há ainda o emprego de outros tipos de detecção nos métodos cromatográficos, como a determinação de tobramicina com detecção amperométrica realizada por STATLER publicada em 1990.^[69] Recentemente, vêm ganhando destaque os métodos que empregam a CLAE acoplada aos detectores de nebulização da amostra e espalhamento de luz (no inglês, *evaporative light scattering*) na análise de aminoglicosídeos e alguns trabalhos já foram publicados, como o de CLAROT e colaboradores^[70] sobre a determinação de sulfato de gentamicina e compostos relacionados e o de MEGOULAS e KOUPPARIS^[71] sobre determinação de tobramicina em produtos farmacêuticos, no plasma e na urina.

A despeito das vantagens e popularização do emprego da CLAE em fase reversa com pareamento iônico, há métodos que utilizam cromatografia em troca iônica, porém, com método de detecção mais sensível, como é o caso do trabalho de SERRANO e SILVA^[72], que descreve um método de determinação de antibióticos aminoglicosídeos em amostras de água utilizando cromatografia de troca iônica e detecção por quimioluminescência que, segundo os autores, aumenta a sensibilidade do método.

2.3.2.3 Emprego da CLAE na Análise de Apramicina

Em consulta à literatura, foram encontradas poucas publicações que descrevem a determinação de apramicina isoladamente ou junto a outros aminoglicosídeos empregando cromatografia líquida de alta eficiência.

Com a finalidade de estudar mecanismos de resistência à apramicina e outros aminoglicosídeos frente a enzimas relacionadas a esse processo, LOVERING, WHITE e REEVES^[73] propuseram, em 1984, um método de identificação de três enzimas acetiladoras de aminoglicosídeos através da determinação dos produtos de reação das mesmas com os aminoglicosídeos testados, que foram a tobramicina, sisomicina, canamicina A, netilmicina, neomicina e a apramicina. O método empregou cromatografia líquida de alta eficiência com derivatização pré-coluna com *o*-ftalaldeído e detecção por UV. Primeiramente, eram testados cada aminoglicosídeo individualmente e, em seguida, após a reação com as enzimas; a identificação dos produtos da reação era feita pela comparação dos cromatogramas após a reação com o cromatograma do fármaco não modificado pela enzima.

Um ano depois, POLTA e JOHNSON^[74] desenvolveram um método de separação dos fatores da nebramicina, entre os quais a apramicina e a tobramicina, empregando cromatografia líquida com detecção amperométrica anódica pulsada. Os autores empregaram duas técnicas de injeção: a primeira, injeção em coluna única, consistiu na injeção direta da amostra em uma única coluna neutra de poliestireno; já a segunda consistia no emprego de uma coluna de pré-concentração antes da injeção da amostra na coluna de poliestireno; o eluente utilizado foi a solução de hidróxido de sódio 0,25 M. De acordo com os autores o método demonstrou ser confiável e útil, principalmente para monitoramentos de caldos de fermentação durante a produção de apramicina e tobramicina.

Em 1998 SWEENEY e COLEMAN^[75] relataram um método de determinação de apramicina em tecidos renais suínos empregando cromatografia líquida de alta eficiência e derivatização pré-coluna automatizada com OPA, além de detecção por fluorescência. Os autores utilizaram um espectrômetro de massas acoplado ao sistema de CLAE para determinar a massa do derivado formado com este método e desta forma assegurar que a reação da apramicina com o OPA tinha sido completa. O método obtido demonstrou linearidade na faixa de 10 a 100 ng/mL,

com coeficiente de correlação linear igual a 0,989; o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4,8 a 7,1 % para 1,0 ppm e de 9,6 a 14,3% para 0,5 ppm. A recuperação foi maior que 80%. Os autores consideraram que seus resultados foram melhores do que os geralmente obtidos em ensaios semelhantes por outros autores devido à dificuldade de extração dos aminoglicosídeos dos constituintes dos tecidos.

Um procedimento simples, seletivo e sensível foi proposto em 2004 por BOGIALLI^[76] e colaboradores para a determinação de resíduos de nove aminoglicosídeos no leite bovino, entre eles, a apramicina. O método consistiu na extração dos aminoglicosídeos através da dispersão da matriz em fase sólida utilizando-se água aquecida a 70°C e, a seguir, injeção da amostra em um sistema de cromatografia líquida equipado com um detector de massa. As porcentagens de recuperação variaram entre 70% e 92%. O uso de aminosidina como padrão interno fez com que a exatidão do método variasse entre 80% e 107% nos três níveis de concentração estudados: o primeiro correspondendo à metade do limite máximo de resíduo permitido, o segundo correspondendo ao limite máximo e o terceiro correspondendo a 1,5 vezes o mesmo limite. Os limites de quantificação estiveram entre 2 ng/mL (apramicina) e 13 ng/mL (estreptomicina), ambos abaixo dos níveis de tolerância estipulados pela União Européia e pelo FDA.

Baseados no trabalho de SWEENEY e COLEMAN^[75], em 2007 ZHANG e colaboradores^[27] também publicaram um trabalho de determinação de apramicina em alimentos de uso veterinário, com extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência, com derivatização pré-coluna empregando-se *o*-ftalaldeído (OPA) e, conseqüentemente, detecção por fluorescência. Também neste caso a derivatização foi automatizada e empregou-se um espectrômetro de massas acoplado ao sistema cromatográfico para, como no trabalho de SWEENEY e COLEMAN^[75], confirmar a reação completa da apramicina com o OPA. A apramicina foi extraída das amostras de alimentos empregando-se solução de HCl 0,1M e coluna MCX. O extrato purificado obtido reagiu com OPA e o derivado formado foi separado dos demais componentes da matriz numa coluna C18. A detecção foi feita por fluorescência e, também neste caso, utilizou-se um espectrômetro de massas para comprovar a derivatização completa da apramicina em suas quatro aminas primárias. Foram testados cinco níveis de padrões, sendo 5 replicatas de cada nível com obtenção de boa linearidade; a exatidão obtida através do método de recuperação foi maior que 92% e os desvios padrão entre as replicatas de mesma concentração foram menores que 6,5%. Os limites de detecção e de quantificação foram,

respectivamente, 0,01 e 0,05 $\mu\text{m/mL}$. O método não apresentou interferências da apramicina com outros compostos possivelmente presentes na matriz, tais como aminoácidos.

Em 2008, ZHU^[77] et al. publicaram um método de determinação simultânea de resíduos de 13 aminoglicosídeos, incluindo a apramicina, em alimentos de origem animal por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray. Os aminoglicosídeos foram extraídos das diferentes matrizes em dois tipos de fase sólida, uma com $\text{pH} < 1$ e outra com $\text{pH} 8,5$ (devido aos diferentes valores de pK_a dos mesmos), com ácido trifluoroacético 5% como eluente. A eluição ao longo do sistema de CLAE foi feita empregando-se modo gradiente numa coluna C18, apolar, de 150 x 2 mm x 5 μm . O novo método foi validado de acordo com as diretrizes 2002/657/EC da Comissão da União Européia e demonstrou boa performance quanto à recuperação, precisão, linearidade, especificidade, estabilidade e limites de detecção e quantificação nas diferentes matrizes.

2.3.3 Outros Métodos para Determinação de Apramicina

Além dos métodos supra descritos empregando CLAE, encontrou-se ainda na literatura um trabalho sobre determinação de apramicina, tobramicina e canamicina em formulações farmacêuticas por espectrofotometria, proposto em 1984 por BONTCHEV^[78] e colaboradores. O método se baseou na formação de um íon-par entre o antibiótico protonado e a forma aniônica do azul de bromotimol em um meio levemente ácido; o íon-par formado era então extraído do clorofórmio e a absorbância era medida em 430 nm. Obteve-se boa correlação com o método microbiológico oficial. A linearidade, a exatidão e a precisão foram avaliadas, mas, no caso da exatidão, não se trabalhou com vários níveis de concentração dos fármacos. Também não foram feitos testes de robustez nem de especificidade do método, o que não assegura que este seja seletivo no caso de uma mistura de compostos, ou ainda no caso da presença de outros componentes no meio com propriedades semelhantes, que também sejam capazes de formar o íon-par.

Para que novos métodos de determinação de apramicina sejam propostos, sobretudo para análises de preparações farmacêuticas, há que se considerar e estudar o método oficial, bem

como os métodos já publicados, tanto para a apramicina como para os demais aminoglicosídeos, no que se refere às suas vantagens e limitações. As tendências no emprego de técnicas analíticas que proporcionem métodos exatos, precisos, reprodutíveis e rápidos, como é o caso da cromatografia líquida de alta eficiência, também precisam ser consideradas.

A validação é outro ponto fundamental e extremamente importante quando se pensa na proposição de novos métodos analíticos, sobretudo quando os mesmos podem ser destinados para uso em análises de rotina de controle de qualidade.

2.4 Validação de Métodos Analíticos

2.4.1 Fundamentos gerais

A validação é o processo que fornece evidência documentada de que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com a aplicação que requer. A validação deve ainda garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.^[79,46]

É importante que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio por eles executados proporcionam obtenção de resultados confiáveis e adequados à finalidade pretendida. Quando um método já existente sofrer modificações para atender a requisitos específicos, ou se um novo método for desenvolvido, o laboratório deverá se assegurar de que as características de desempenho do método estão apropriadas para as operações analíticas pretendidas.^[80]

Para que se possa proceder à validação de um método é importante que todos os equipamentos e materiais estejam devidamente calibrados e os analistas qualificados e devidamente treinados. Deve-se utilizar substâncias químicas de referência e/ou padrões oficializados pela Farmacopéia Brasileira ou por outros códigos autorizados pela legislação vigente.

Após o cumprimento de todas as etapas do processo de validação é importante documentar os procedimentos de forma que a implantação do método possa ser feita de modo

claro e sem ambigüidades. A documentação deve, portanto, minimizar a introdução de variação acidental no método. A documentação é também importante para efeito de registro e avaliação do processo de validação e podem ser requeridas por razões contratuais ou até mesmo por organismos regulamentadores.^[80]

2.4.2 Parâmetros de validação

De acordo com as Farmacopéias Americana, com a resolução RE nº 898 de 29 de maio de 2003 da ANVISA^[79] e com procedimento de validação de métodos analíticos do ICH (International Conference of Harmonisation) ^[81], um estudo de validação deve contemplar a avaliação dos seguintes parâmetros: robustez, especificidade/seletividade, linearidade, exatidão, precisão e limites de quantificação e detecção.

As metodologias analíticas podem ser classificadas em diferentes categorias de acordo com a sua finalidade, conforme pode ser visto na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1. Classificação dos métodos analíticos

Categoria	Finalidade do Teste
I	Testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução e liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: Resolução RE nº 898 de 29 de maio de 2003 da ANVISA

O procedimento de validação a ser adotado vai depender do tipo de metodologia analítica. Um método destinado à determinação do teor de uma substância numa forma farmacêutica requer uma abordagem diferente de outro que será destinado à análise de impurezas, ou traços, por exemplo. A frequência com que um método será utilizado também influencia o tipo de estudo de validação necessário. Deve-se, portanto, validar os métodos considerando-se os parâmetros analíticos relacionados à intenção do uso do método, ou seja, limitar os experimentos de validação para o que realmente é necessário. A Tabela 2 relaciona os procedimentos de validação que deve ser adotado conforme a categoria do método analítico em questão.^[46,79,81]

Tabela 2. Conjunto de testes exigidos para validação dos métodos analíticos

Parâmetro	Categoria II				
	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	SIM	SIM	SIM	*	SIM
Linearidade	SIM	SIM	NÃO	*	NÃO
Intervalo ou faixa	SIM	SIM	*	*	NÃO
Precisão Repetibilidade	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO
Intermediária	**	**	NÃO	**	NÃO
Limite de Detecção	NÃO	NÃO	SIM	*	NÃO
Limite de Quantificação	NÃO	SIM	NÃO	*	NÃO
Exatidão	SIM	SIM	*	*	NÃO
Robustez	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO

Fonte: Resolução RE nº 898 de 29 de maio de 2003 da ANVISA

*Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico

**Se houver comprovação de reprodutibilidade não é necessário a comprovação da precisão intermediária.

2.4.2.1 Robustez

A robustez é a medida da capacidade de um método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. No caso de métodos cromatográficos por exemplo, alguns parâmetros cuja variação pode afetar a resposta produzida pelo método são: tipo de coluna, temperatura, pH e composição da fase móvel, tipo de coluna. A avaliação da robustez deve ser considerada ainda durante a fase de desenvolvimento do método e irá depender do tipo de procedimento em estudo.^[46,79,81,82]

De acordo com SHABIR^[83], as variações podem ser realizadas em um parâmetro por vez ou ainda em vários deles simultaneamente, através de delineamento estatístico, como é o caso do teste de Youden, recomendado pelo INMETRO^[80], que permite também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais. Uma vez constatada a susceptibilidade do método à variações das condições analíticas, estas deverão ser devidamente controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

2.4.2.2 Especificidade e seletividade

Considera-se que um método é específico quando possui a capacidade de medir exatamente um composto na presença de outros componentes tais como impurezas, substâncias relacionadas, produtos de degradação e componentes da matriz. Assegurar a especificidade/seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um bom método e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e uso subsequente do método, uma vez que em alguns casos as amostras podem sofrer degradação gerando compostos que não foram inicialmente observados e que podem interferir com a substância de interesse.^[46,79,82]

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz respostas para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que se pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é

chamado seletivo. Entretanto, freqüentemente se utilizam ambos os termos indistintamente ou com diferentes interpretações.^[80,82]

Em 1988 SWARTZ e KRULL^[84] comentaram que o termo “específico” deve ser usado para avaliar a resposta analítica para um único componente em exame. Já o termo “seletivo” é considerado pelos autores como adequado para descrever um método que dá resposta para diferentes componentes que podem ou não ser diferenciados um do outro.

Quando se trabalha com métodos destinados à análise qualitativa, como testes de identificação, por exemplo, é necessário demonstrar a sua capacidade de seleção entre compostos de estruturas relacionadas que possam estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (de preferência frente a um material de referência conhecido) em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contêm o fármaco, mas compostos estruturalmente semelhantes.^[79,81]

No caso de métodos destinados à análise quantitativa e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada através da comparação de resultados obtidos da matriz isenta da substância de interesse e a matriz acrescida de quantidades conhecidas da mesma sendo que, nesse caso, nenhum componente da matriz pode interferir com a resposta do componente de interesse. A matriz pode ser acrescida não somente da substância de interesse, mas também de quaisquer outros possíveis interferentes, tais como produtos de degradação e/ou substâncias relacionadas (ao composto de interesse), impurezas e excipientes para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais.^[79,80,81,82]

No caso da indisponibilidade de substâncias relacionadas e/ou impurezas, a matriz pura e a matriz contendo a substância de interesse devem ser submetidas a diferentes condições de estresse, tais como hidrólise ácida, básica, calor, luz e oxidação numa tentativa de forçar a degradação do composto de interesse e possivelmente de compostos contidos na matriz cujos produtos possam interferir com a substância que está sendo medida. Posteriormente comparam-se os resultados obtidos para essas amostras com os da matriz contendo a substância de interesse e também da matriz isenta da mesma antes da degradação.^[79,80,81,82]

Pode-se ainda comparar os resultados do teste das matrizes contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados obtidos de um segundo procedimento bem caracterizado, uma metodologia farmacopéica ou outro procedimento validado.^[79,81]

2.4.2.3 Linearidade e faixa linear de trabalho

Entende-se por linearidade a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico. Sua determinação pode ser estabelecida graficamente através da construção de uma curva analítica que relaciona os valores obtidos das medidas em função da concentração do analito. Recomenda-se que seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes e com cada uma delas em replicata ($n \geq 2$).^[46,79,80,81,82]

O intervalo, faixa de aplicação ou faixa linear de trabalho é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior dentro da qual os resultados obtidos através de um determinado método analítico atendem aos critérios de exatidão, precisão e linearidade. Deve ser determinado na faixa de concentração na qual será realizado o ensaio, o que depende da aplicação pretendida do método. A concentração da amostra deverá se situar, sempre que possível, no centro da faixa de trabalho e os valores medidos têm de estar linearmente correlacionados às concentrações. O limite inferior deverá ser maior ou igual ao limite de quantificação do método.^[46,79,80,81,82]

A curva analítica obtida deverá ser tratada por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo entre as replicatas. Quanto mais próximo de 1,0 for o coeficiente de correlação linear (R), mais a curva pode ser considerada como modelo matemático. Para ensaios físico-químicos, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R), de acordo com a ANVISA deve ser de 0,99.^[79]

2.4.2.4 Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A precisão reflete a capacidade de reproduzir o mesmo método, mas não necessariamente o resultado correto ou o esperado, toda vez que seja realizado conforme

padronizado. É expressa através da variância, coeficiente de variação ou desvio padrão dos valores observados e pode ser considerada em três níveis distintos: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.^[46,79,80,81,82]

A repetitividade ou repetibilidade expressa a concordância entre os resultados de sucessivas medidas do mesmo método sob as mesmas e constantes condições de medição. Pode ser verificada por, no mínimo, nove determinações dentro do intervalo linear do método, ou seja, envolve o preparo e determinação do teor de amostras em três níveis de concentração (o nível esperado (100%), um nível acima e outro abaixo (por exemplo, 80 e 120%, para o caso de métodos destinados à determinação de teor)) com três réplicas para cada nível. Outra forma de avaliação de repetitividade consiste em se realizar, no mínimo, 6 determinações de teor de uma amostra cuja concentração esteja próxima ao valor esperado (100%).^[79,81,82]

A precisão intermediária expressa a concordância entre resultados obtidos num mesmo laboratório, quando se analisa a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, porém, em dias diferentes, com equipamentos e/ou analistas diferentes ou ainda uma combinação destes fatores. O objetivo da avaliação da precisão intermediária é verificar que o mesmo método sendo aplicado dentro do mesmo laboratório produz sempre os mesmos resultados quando realizado sob as mesmas condições. A determinação da precisão intermediária é feita da mesma forma que a repetitividade, porém, em, no mínimo, 2 dias diferentes com analistas e/ou equipamentos diferentes.^[79,81,82]

A reprodutibilidade expressa o grau de concordância entre resultados de medições de uma mesma amostra efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, reagentes, colunas, etc.) como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica para, por exemplo, inclusão da mesma em farmacopéias.^[46,79,80,81,82]

2.4.2.5 Exatidão

A exatidão pode ser definida como a proximidade dos resultados obtidos com a aplicação de um método em estudo em relação ao valor referência, aceito como verdadeiro. A exatidão do

método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo.^[46,79,80,81,82]

O número de ensaios para determinação da exatidão pode variar segundo a legislação ou diretriz adotada e também em função das características do método em questão. De acordo com o ICH^[81] e a ANVISA^[79], deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 concentrações baixa, média e alta, com três réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

Os procedimentos geralmente empregados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: comparação dos valores obtidos na análise de uma amostra através do método em questão com o valor certificado do material de referência; comparação dos resultados obtidos pela aplicação do método em estudo/desenvolvimento com aqueles obtidos com um método de referência; teste de recuperação, que consiste na adição de um padrão à matriz da amostra, sem o componente de interesse e posterior comparação da quantidade recuperada com a quantidade conhecida adicionada; teste de adição de padrão, no qual quantidades conhecidas do analito são adicionadas em diferentes níveis de concentração a uma matriz da amostra que já contém o composto de interesse, sendo a recuperação calculada pela comparação da quantidade recuperada com a quantidade conhecida adicionada, considerando-se a quantidade de analito que já estava presente na amostra.^[79,80,81,82]

2.4.2.6 Limite de detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser determinado de 3 formas:

- Método Visual, que consiste na adição de concentrações conhecidas decrescentes da substância de interesse até que se atinja a menor concentração na qual se possa distinguir entre ruído e sinal

analítico através relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica. Pode ser aplicada com metodologias instrumentais e não-instrumentais;

- Relação Sinal-Ruído, feita através da comparação do sinal da amostra com baixas concentrações conhecidas do composto de interesse com o sinal do branco (amostra sem o composto de interesse); a relação sinal-ruído deve ser de 3:1 ou 2:1;
- Parâmetros da Curva Analítica: O limite de detecção pode ser estimado através da seguinte equação:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

onde DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações da substância de interesse próximas ao suposto limite de quantificação; o desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração. ^[79,80,81,82]

2.4.2.7 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão sob condições experimentais pré-estabelecidas. Como no caso do limite de detecção, o limite de quantificação também pode ser determinado pelos métodos visual, da relação sinal-ruído e ainda do método baseado nos parâmetros da curva analítica da mesma forma como descrito anteriormente. Entretanto, a proporção da relação sinal-ruído passa a ser 10:1 e, no caso do uso dos parâmetros da curva analítica, a equação a ser usada para estimar LQ passa a ser:

$$LQ = \frac{10 \times DP_a}{IC}$$

DP_a e IC representam os mesmos termos descritos anteriormente para o limite de detecção.

De acordo com SNYDER^[48] e colaboradores, especial atenção deve ser dada aos métodos que empregam cromatografia líquida de alta eficiência durante a determinação dos limites de detecção e de quantificação, pois os mesmos são afetados pelas condições de separação: colunas, reagentes e especialmente a instrumentação e os sistemas de dados. Mudanças instrumentais, particularmente no sistema de bombeamento e detectores, ou ainda o uso de reagentes contaminados podem resultar em mudanças consideráveis na relação sinal/ruído.^[79,80,81,82]

2.4.2.8 Revalidação de metodologias analíticas

A revalidação é uma nova validação de um método analítico em função de mudança em algum aspecto que possam afetar o seu desempenho e, portanto, os resultados gerados. De acordo com o guia do ICH^[81] e com RIBANI^[82], pode ser necessário revalidar um método analítico diante das seguintes circunstâncias: mudanças na síntese da droga, mudanças na composição do produto final e mudanças no procedimento analítico.

Considera-se ainda a possibilidade de revalidação do método quando a proposta e/ou o nível de qualidade desejado do mesmo são alterados ou mesmo quando um método é usado novamente após certo período de tempo.^[81,82]

3 OBJETIVO

Considerando-se as desvantagens do doseamento turbidimétrico e ainda a inexistência de métodos físico-químicos oficiais para quantificação da apramicina em formas farmacêuticas, torna-se desafio interessante o desenvolvimento de um método que reúna em si as diversas vantagens da cromatografia líquida de alta eficiência e que possa ser empregado para controle de qualidade do produto acabado. Por outro lado, há que se considerar a importância do método microbiológico, pois uma redução na atividade microbiana revela mudanças sutis não demonstráveis pelos métodos físico-químicos, de modo que o novo método físico-químico não elimina a potencial necessidade de confirmação da potência do antibiótico por um método microbiológico.^[46]

Tendo em vista que o único método oficial para determinação do teor de apramicina é o doseamento microbiológico por turbidimetria descrito pela Farmacopéia Britânica^[8], este trabalho teve por objetivo desenvolver e validar um método físico-químico de determinação do teor de apramicina em pó solúvel empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), bem como compará-lo ao método microbiológico oficial já existente.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

4.1.1 Material Objeto de Estudo

Foram ensaiados 3 lotes de amostras comerciais contendo sulfato de apramicina na apresentação de pó oral solúvel contendo 44,4g de apramicina em cada 100g.

4.1.2 Padrões de Referência

Foram utilizados como substâncias padrões de referência o sulfato de apramicina fornecido pelo laboratório Eli Lilly, com potência de 873,3 µg/mg e o (sulfato) de tobramicina USP, lote LOB307.

4.1.3 Equipamentos

- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência marca TSP Spectra System equipado com degaseificador SCM 1000, bomba binária P2000, injetor automático AS3000, detector de UV/Visível UV 2000 e detector de fluorescência FL 3000;
- Banho de Ultrassom com controlador de temperatura marca Unique modelo Ultrasonic Clear;
- Autoclave marca Sercon modelo HSE19;
- Espectrofotômetro Visível marca Unicam, modelo Helyos e;

- Espectrofotômetro UV-Visível marca Unicam, modelo Helyos Alpha;
- Balança Analítica marca Mettler Toledo modelo AG 204;
- Balança Semi-Analítica Gehaka modelo BG 1000;
- Cronômetro Digital marca Instrutherm modelo CD-2800;
- Banho Ultrassônico marca NDI modelo 104H;
- pH metro Micronal B474;
- Coluna para CLAE (1): Gemini C18, 250 mm x 4,6 mm x 5 μm – marca Phenomenex, Serial #273996-28;
- Coluna para CLAE (2): Zorbax C18 250 mm x 4,6 mm x 4 μm – marca Agilent, Serial # ZODS-3752;
- Coluna para CLAE (3): Synergi Hydro C18, 150 mm x 4,6 mm x 4 μm – marca Phenomenex, lote 394129-13.

4.1.4 Reagentes

- Água purificada;
- Acetonitrila grau HPLC marca Carlo Erba;
- Metanol grau HPLC marca J.T.Baker;
- Isopropanol p.a. marca J.T.Baker;
- Ácido Acético p.a. marca J.T.Baker;
- Ácido 1-octanossulfônico, sal sódico marca J.T.Baker;
- 2-mercaptoetanol p.a. marca Sigma Aldrich;
- Ácido Mercaptoacético marca J.T.Baker;
- Ácido Clorídrico p.a. marca Carlo Erba;
- *o*-Ftalaldeído (OPA) reagente pronto para derivatização marca Sigma Aldrich;

- *o*-Ftalaldeído (OPA) p.a. marca Sigma Aldrich;
- Hidróxido de Potássio p.a. marca Carlo Erba;
- Hidróxido de Sódio p.a. marca Carlo Erba;
- Fosfato de Potássio Monobásico p.a. marca J.T.Baker;
- Fosfato de Potássio Dibásico p.a. marca Merck;
- Peróxido 30% p.a. marca Carlo Erba;
- Formaldeído p.a., marca Carlo Erba;
- Ácido Bórico p.a. marca Vetec;
- Cloreto de Sódio p.a., marca J T Baker;
- Extrato de Carne, marca Difco;
- Extrato de Levedura marca Difco;
- Peptona, marca Difco;
- Dextrose, marca Difco;
- Caldo de caseína-soja fornecido pela Difco.

4.1.5. Microrganismo-Teste

O microrganismo-teste utilizado foi a *Salmonella cholerasuis* ATCC 13311, fornecido pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL).

4.2 Método

4.2.1 Desenvolvimento do método físico-químico por CLAE

4.2.1.1 Preparo das soluções e fase móvel empregadas

- Solução Tampão Borato pH 10,4 (segundo BP 2008^[28] e USP XXXII^[85]) – dissolveram-se 2,47 g de ácido bórico em 75 mL de água purificada; ajustou-se o pH para 10,4 com solução de KOH 45% e completou-se o volume para 100 mL com o mesmo solvente;
- Solução Tampão Borato pH 9,5 (segundo trabalho de Zhang^[27] et al.)– dissolveram-se 2,47 g de ácido bórico dissolvidos em 90 mL de água, ajustou-se o pH para 9,5 com solução de NaOH 6M e completou-se o volume para 100 mL com o mesmo solvente;
- Solução de Derivatização de OPA I (segundo BP 2008^[28] e USP XXXII^[85]) – foram misturados 500,4 mg de OPA p.a. a 2,5 mL de metanol; a seguir foram adicionados 47,5 mL de solução tampão borato pH 10,4 e 1,0 mL de ác. mercaptoacético. Homogeneizou-se e ajustou-se o pH da solução para 10,4 com solução aquosa de KOH 45%. Esta solução tem prazo de validade de 3 dias após o preparo e durante este período foi conservada em geladeira e ao abrigo da luz;
- Solução de Derivatização de OPA II (segundo trabalho de Zhang^[27] et al.) – foram pesados 133,8 mg de OPA p.a. e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL; a seguir, adicionaram-se 5,0 mL de metanol e 100 µL de 2-mercaptoetanol; após homogeneização, completou-se o volume do balão com solução tampão borato pH 9,5. Esta solução também foi conservada em geladeira e ao abrigo da luz;
- Solução Padrão Teste de Apramicina – foram pesados 20,2 mg de apramicina padrão de referência e transferidos quantitativamente para balão volumétrico âmbar de 100 mL; posteriormente, dissolveu-se o conteúdo em água purificada e completou-se o volume do balão com o mesmo solvente;
- Solução Padrão Teste de Tobramicina – foram pesados 19,9 mg de tobramicina padrão de referência e transferidos quantitativamente para balão volumétrico âmbar de 100 mL; posteriormente, dissolveu-se o conteúdo em água purificada e completou-se o volume do balão com o mesmo solvente;

- Preparo da Solução Amostra Teste— foram pesados e transferidos quantitativamente 1,0058 g de pó oral solúvel para balão volumétrico de 250 mL; dissolveu-se o conteúdo e posteriormente completou-se o volume com água purificada. Pipetou-se 10,0 mL desta solução para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume do balão com água purificada e homogeneizou-se a solução;
- Fase Móvel para CLAE:
 - Bomba A: Solução de Octanossulfonato de Sódio (Pic B8) – foram dissolvidos 1,8015g de ác. 1-octanossulfônico em 600 mL de água purificada; posteriormente foram adicionados 20 mL de ácido acético e homogeneizou-se;
 - Bomba B: Acetonitrila.
 - Proporção Inicial Bomba A: Bomba B - 60:40.

Como o sistema cromatográfico de trabalho possuía bomba binária, trabalhou-se em um canal com acetonitrila e no outro com a solução de octanossulfonato de sódio; a proporção entre a fase orgânica e aquosa foi alterada à medida que o método foi sendo desenvolvido e otimizado (vide item 5.1.).

4.2.1.2 Procedimento de derivatização – utilização do reagente de derivatização de OPA adquirido pronto para uso

Em um balão volumétrico âmbar de 10 mL, adicionou-se 1,0 mL de solução padrão de apramicina e 1,0 mL do reagente de derivatização; agitou-se o balão manualmente durante 1 minuto e completou-se o volume do mesmo com água purificada. Cronometraram-se 35 minutos durante os quais a solução permaneceu em repouso e logo após filtrou-se a mesma através de membrana tipo Millex[®] 0,5 µm para vial e foram injetados 50 µL no sistema cromatográfico. Nos testes preliminares de adequação do sistema cromatográfico, foram cronometrados 90 minutos para garantir reação completa do OPA com a apramicina contida em solução.

Realizou-se este procedimento de derivatização para os testes preliminares, após os quais foi abolido. (vide maiores detalhes nos itens 5.1.4.).

4.2.1.3 Procedimento de derivatização – utilização da solução de derivatização OPA I/OPA II

Em um balão volumétrico âmbar de 10 mL, foram adicionados 2,0 mL de solução padrão de apramicina e 0,2 mL de solução de derivatização em questão; agitou-se o balão manualmente durante 1 minuto e completou-se o volume do mesmo com água purificada. Foram cronometrados 90 minutos durante os quais a solução permaneceu em repouso e logo após filtrou-se a mesma através de membrana tipo Millex[®] 0,5 µm para vial e foram injetados 50 µL no sistema cromatográfico.

Nos testes de otimização de seletividade em relação à tobramicina, adicionou-se 1,0 mL de solução padrão de apramicina e 1,0 mL de solução padrão de tobramicina e prosseguiu-se à derivatização conforme descrito acima.

Nos casos em que foi preparado um branco, o mesmo consistiu apenas do volume pipetado da solução derivatização de OPA e do diluente, a água purificada.

Este procedimento sofreu alterações quanto ao tempo de reação e à proporção das concentrações de OPA e apramicina à medida que se trabalhou no sentido da otimização do método.

4.2.1.4 Condições do Sistema Cromatográfico Empregadas no Início do Desenvolvimento do Método

- Fase Móvel (Bomba A) – Solução de Octanossulfonato de Sódio – 60%;
- Fase Móvel (Bomba B) – Acetonitrila – 40%;
- Fluxo - 1,0 mL/minuto;
- Comp. Onda de Detecção - UV: 354 nm; Fluorescência: Exc.: 230 nm e Em.: 390 nm;
- Volume de Injeção: 50 µL;
- Temperatura: Ambiente;

- Coluna: Gemini C18, 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m;

Assim como no caso do procedimento de derivatização, essas condições foram sendo posteriormente alteradas à medida que o método foi sendo otimizado.

4.2.2 Validação do método cromatográfico recém-desenvolvido

4.2.2.1 Preparo das soluções empregadas

- Solução de HCl 0,1M: Foram transferidos cerca de 200 mL de água purificada para um balão volumétrico de 1L. A seguir, foram adicionados 8,5 mL de ácido clorídrico p.a., agitou-se e logo após completou-se o volume com água purificada e homogeneizou-se a solução;
- Solução de NaOH 0,1M: Foram pesados 4,01g de hidróxido de sódio p.a. em um béquer de 250 mL e dissolveu-se em cerca de 200mL de água purificada. Transferiu-se o conteúdo quantitativamente para um balão volumétrico de 1L e completou-se o volume com água purificada; homogeneizou-se a seguir;
- Solução de Peróxido de Hidrogênio 3,0%: Foram pipetados volumetricamente 5 mL de peróxido de hidrogênio p.a. e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL; adicionou-se 25 mL de água purificada, agitou-se e logo após o volume do balão foi completado com água purificada e homogeneizou-se a solução.

4.2.2.2. Preparo da solução padrão estoque de apramicina para robustez

Foram pesados e transferidos quantitativamente 20,1 mg de apramicina padrão de referência para balão volumétrico de 100 mL; dissolveu-se e completou-se o volume do balão com água purificada. Logo após, procedeu-se à derivatização conforme item 4.2.2.7. e às injeções

conforme condições cromatográficas descritas em 4.2.2.8., porém, com pequenas alterações em alguns parâmetros para avaliação do comportamento do método, o que está melhor detalhado no item 5.3.1.

4.2.2.3. Preparo das soluções-padrão para linearidade

Foram construídas 3 curvas de calibração distintas e, para cada uma delas, foram preparadas 6 soluções padrão de trabalho de apramicina em diferentes níveis de concentração, conforme mostra a Tabela 3.

As tomadas de ensaio de apramicina padrão de referência indicadas na Tabela 3 foram transferidas quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, ao qual foram adicionados 50 mL de água purificada para permitir completa dissolução do padrão; o volume do balão foi posteriormente completado com o mesmo diluente. Este procedimento originou as Soluções Padrão Estoque de Apramicina nas concentrações de 60%, 75%, 90%, 100%, 115% e 130% (em relação à concentração final de apramicina após preparo da Solução Amostra, conforme descrito no item 4.2.1.1).

Posteriormente, estas soluções foram submetidas à derivatização com solução de OPA como descrito no item 4.2.2.7. e logo após injetadas conforme condições descritas no item 4.2.2.8.

Tabela 3. Tomadas de ensaio de apramicina padrão de referência utilizadas no preparo das soluções padrão estoque de apramicina utilizadas para o teste de linearidade

	Curva 1	Curva 2	Curva 3
	Massa Apramicina (mg)	Massa Apramicina (mg)	Massa Apramicina (mg)
60%	12,0	12,3	11,8
75%	14,6	15,1	15,5
90%	18,2	18,2	18,2
100%	20,3	20,3	19,9
115%	22,8	22,8	22,5
130%	26,1	26,1	26,4

4.2.2.4 Preparo das soluções sob degradação forçada para a seletividade

- Hidrólise Ácida: foram preparadas 3 soluções submetidas à hidrólise ácida, sendo que para a solução 1 (Solução Hidrólise Ácida 1) foram pesados 10,1 mg de apramicina padrão de referência, para a solução 2 (Solução Hidrólise Ácida 2), 10,3 mg e para a solução 3 (Solução Hidrólise Ácida 3), 10,0 mg. Em cada caso, as massas foram transferidas quantitativamente para respectivos balões volumétricos de 50,0 mL. A cada balão foram adicionados 25 mL de solução de ácido clorídrico 0,1M, agitou-se mecanicamente até completa dissolução e completou-se o volume de cada um com o mesmo diluente. No caso da solução 1, o balão foi deixado à temperatura ambiente e exposto à luz por duas horas; a solução 2 foi exposta à temperatura ambiente por uma hora e a solução 3 foi exposta à temperatura ambiente por um período de 2 horas, ao término do qual teve seu pH ajustado para $7,0 \pm 0,05$ com NaOH 0,1M;
- Hidrólise Alcalina: foram pesados e transferidos quantitativamente 10,2 mg de apramicina padrão de referência para balão volumétrico de 50,0 mL. Adicionaram-se 25 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1M, agitou-se mecanicamente até completa dissolução e completou-se o volume do balão com o mesmo diluente. O balão foi deixado

à temperatura ambiente e exposto à luz por duas horas. Em um segundo momento, foi preparada outra solução, para a qual foram pesados 9,9 mg de apramicina padrão de referência que também foram transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e seguido o mesmo procedimento descrito para a primeira solução. Esta solução também ficou exposta à luz, à temperatura ambiente por duas horas, ao final das quais teve seu pH ajustado para $7,0 \pm 0,05$ com HCl 0,1M (Solução Hidrólise Alcalina 2);

- Oxidação: foram pesados e transferidos quantitativamente 10,7 mg de apramicina padrão de referência para balão volumétrico de 50,0 mL. Adicionaram-se 25 mL de solução de peróxido de hidrogênio 3,0%, agitou-se mecanicamente até completa dissolução e completou-se o volume do balão com o mesmo diluente. O balão foi deixado à temperatura ambiente e exposto à luz por duas horas (Solução Oxidação 1). Posteriormente foi preparada uma segunda solução (Solução Oxidação 2), para a qual foram pesados 10,5 mg de apramicina padrão de referência e efetuou-se o mesmo procedimento acima. Esta solução permaneceu exposta à luz e à temperatura ambiente por uma hora;
- Degradação Térmica: pesaram-se e transferiram-se quantitativamente 10,2 mg de apramicina padrão de referência para balão volumétrico de 50,0 mL. Adicionaram-se 25 mL de água purificada, agitou-se mecanicamente até completa dissolução e completou-se o volume do balão com o mesmo diluente. O balão foi deixado em banho-maria (100°C) por duas horas;
- Para cada uma das condições acima, coletou-se e transferiu-se quantitativamente uma alíquota de 10,0 mL de cada solução (Solução 1 nas condições com mais de uma solução) ao final da primeira hora de exposição e outra, ao final da segunda hora para respectivos balões volumétricos âmbar de 50 mL, as quais foram submetidas à derivatização e posterior injeção conforme itens 4.2.2.7. e 4.2.2.8;
- Paralelamente foram realizados testes de seletividade submetendo-se o placebo (excipiente da amostra) aos tratamentos acima. Para tanto, foram pesados, em cada tratamento, 55,0 mg de bicarbonato de sódio para balão volumétrico de 100 mL, e procedeu-se à hidrólise ácida e alcalina, oxidação e degradação térmica conforme descrito acima. A seguir, também foram feitas a derivatização e a injeção segundo os itens 4.2.2.7. e 4.2.2.8. para a amostra coletada ao final da primeira hora de exposição e para a amostra coletada ao final da segunda hora de exposição;

- Na segunda etapa do teste, foram coletadas alíquotas de 10,0 mL da Soluções Hidrólise Ácida 2 e da Solução Oxidação 2 a cada quinze minutos durante uma hora desde o início da exposição. As alíquotas foram transferidas quantitativamente para respectivos balões volumétricos âmbar de 50 mL e submetidas à derivatização e injeção de acordo com os itens 4.2.2.7. 4.2.2.8;
- Em uma terceira etapa do teste, foi preparada uma solução padrão de apramicina pela pesagem de 10,3 mg que foram quantitativamente transferidos para um balão volumétrico de 50 mL; dissolveu-se e completou-se o volume do balão com água purificada. Logo após efetuou-se a leitura do pH da solução. A seguir, foram retiradas alíquotas de 10,0 mL desta solução, da Solução Hidrólise Ácida 3 e da Solução Hidrólise Alcalina 2, sendo estas duas últimas após o período de exposição e ajuste do pH. Logo após foram efetuadas a derivatização e a injeção de cada uma delas conforme descrito nos itens 4.2.2.7 4.2.2.8.

4.2.2.5 Preparo das amostras para o teste de exatidão

A exatidão foi avaliada empregando-se o teste de recuperação. Inicialmente, preparou-se uma solução chamada solução placebo através da pesagem de 1112,1 mg de bicarbonato de sódio que foram transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 1L. A seguir, dissolveu-se o conteúdo, completou-se o volume do balão com água purificada e homogeneizou-se.

Foram preparadas 9 soluções amostra contendo quantidades conhecidas de apramicina, sendo 3 níveis de concentração e para cada nível, 3 amostras, conforme mostra a tabela abaixo. As massas pesadas foram transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL;

Tabela 4: Valores das massas pesadas de apramicina padrão de referência para os respectivos níveis de concentração utilizados no teste de recuperação

Amostra	Massa de Apramicina (mg)		
	Solução 70%	Solução 100%	Solução 130%
1	14,0	20,1	26,2
2	14,2	19,9	26,2
3	14,2	20,2	26,0

A seguir, o conteúdo de cada balão foi solubilizado em cerca de 50 mL de solução placebo e o volume de cada balão completado com o mesmo diluente. Após homogeneização, cada solução foi submetida à derivatização e injeção conforme itens 4.2.2.7. e 4.2.2.8.

4.2.2.6 Preparo dos padrões para os limites de detecção e de quantificação

Inicialmente foi verificado e avaliado no cromatograma da solução padrão de trabalho de apramicina 100% o valor da relação sinal-ruído.

A seguir, preparou-se uma solução padrão de trabalho de apramicina 100%, que foi submetida à derivatização de acordo com o item 4.2.2.7 e logo após diluída sucessivamente utilizando-se água purificada como diluente até a obtenção das respectivas concentrações do limite de quantificação e do limite de detecção segundo o critério da relação sinal/ruído.

As soluções correspondentes aos limites de quantificação e detecção foram preparadas em triplicata e injetadas conforme as condições cromatográficas descritas no item 4.2.2.8.

4.2.2.7 Procedimento de derivatização

Em um balão volumétrico âmbar de 50 mL, adicionaram-se 10,0 mL da solução em questão (padrão de robustez, linearidade e especificidade; soluções-padrão e amostras do doseamento) e 1,0 mL da solução de derivatização de OPA I; agitou-se o balão manualmente durante 1 minuto e completou-se o volume do mesmo com água purificada. Cronometrou-se 1 hora durante a qual a solução permaneceu em repouso e logo após a mesma foi filtrada através de membrana tipo Millex[®] 0,5µm para vial e injetou-se 50 µL no sistema cromatográfico nas condições descritas no item 4.2.2.8.

4.2.2.8. Condições nominais do sistema cromatográfico do método recém-desenvolvido empregadas durante a validação e o doseamento de apramicina

- Fase Móvel (Bomba A) – Solução de Octanossulfonato de Sódio – 55%;
- Fase Móvel (Bomba B) – Acetonitrila – 45%;
- Fluxo - 1,0 mL/minuto;
- Comp. Onda de Detecção - UV: 332 nm;
- Volume de Injeção: 50 µL;
- Temperatura: Ambiente;
- Coluna: Synergi Hydro C18, 150 mm x 4,6 mm x 4 µm.

4.2.3 Doseamento de apramicina pelo método físico-químico por CLAE

Foram preparadas 3 amostras de cada um dos 3 lotes de apramicina pó oral solúvel através da pesagem das quantidades indicadas na Tabela 5 abaixo para um balão volumétrico de 500 mL.

Tabela 5. Valores das massas pesadas para cada amostra dos 3 lotes de pó oral solúvel empregadas no doseamento de apramicina pelo método físico-químico por CLAE

Lote	Massa do Pó Oral (mg)		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
A	200,5	200,3	198,4
B	202,2	198,7	200,4
C	200,6	200,4	198,3

A seguir, adicionaram-se cerca de 300 mL de água purificada para cada balão e agitou-se até completa solubilização do pó. O volume do balão foi, posteriormente, completado com o mesmo diluente.

Paralelamente, também foram preparadas soluções padrão de apramicina de 80, 100 e 120% (em relação à concentração teórica da amostra após preparo) através da pesagem de 15,5 mg, 20,1 mg e 24,1 mg, respectivamente, para balões volumétricos de 100 mL. O conteúdo de cada balão foi dissolvido e o volume do mesmo foi completado com água purificada. Estes padrões foram utilizados na construção da uma curva de calibração Área do pico da Apramicina *versus* Concentração, cuja equação da reta foi utilizada nos cálculos do teor de apramicina nas amostras.

Após o preparo das amostras e padrões, procedeu-se então à derivatização e injeção do padrão e das amostras conforme descrito nos itens 4.2.2.7. e 4.2.2.8.. As injeções de cada uma das amostras e dos padrões foram feitas em triplicata.

O teor de apramicina presente nas amostras de cada lote foi calculado a partir da equação

da reta obtida para a curva Área do pico da Apramicina *versus* Concentração, fazendo-se as devidas transformações e considerando-se o fator de diluição da amostra.

4.2.4 Ensaio Microbiológico Turbidimétrico

4.2.4.1 Preparo das Soluções e Meio de Cultura Empregados

- Meio Ágar Nutriente com a seguinte composição:

Extrato de Carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água purificada qsp	1000 mL

Após a pesagem e dissolução de cada componente em água purificada, o pH foi ajustado entre 6,75 e 6,85 com ácido clorídrico 0,1M ou hidróxido de sódio 0,1M e esterilizado em autoclave a 125°C durante 30 minutos.

- Caldo de caseína-soja fornecido pela Difco com a seguinte composição:

Digesto pancreático de caseína	17,0 g
Digesto papaínico de farinha de soja	3,0 g
Cloreto de Sódio	5,0 g
Fosfato de Potássio Dibásico	2,5 g
Glicose	2,5g
Água purificada qsp	1000 mL

Após dissolução do pó em água purificada o pH foi ajustado entre 7,1 e 7,5 com ácido clorídrico 0,1M ou hidróxido de sódio 0,1M e esterilizado em autoclave a 125°C durante 30 minutos.

➤ Meio Antibiótico, com a seguinte composição:

Peptona	5,0 g
Extrato de Carne	1,5 g
Extrato de Levedura	3,0 g
Fosfato de Potássio Monobásico	1,32g
Fosfato de Potássio Dibásico	3,68g
Cloreto de Sódio	3,5g
Dextrose	1,0g
Água purificada qsp	1000 mL

Após a pesagem e dissolução de cada componente em água purificada, o pH foi ajustado entre 6,95 e 7,05 com ácido clorídrico 0,1M ou hidróxido de sódio 0,1M e esterilizado em autoclave a 125°C durante 30 minutos.

➤ Tampão Fosfato 0,1M pH 8,0

Fosfato de Potássio Dibásico	16,73 g
Fosfato de Potássio Monobásico	0,523 g
Água purificada qsp	1000 mL

Após dissolução dos sais o pH foi ajustado entre 7,9 e 8,1 com ácido fosfórico 0,1M. ou hidróxido de sódio 0,1M e esterilizado em autoclave a 125°C durante 30 minutos.

➤ Solução Padrão Estoque de Apramicina – Teste Preliminar: foram pesados e transferidos quantitativamente 100,2 mg de apramicina padrão de referência para balão volumétrico âmbar de 100 mL; posteriormente, dissolveu-se o conteúdo em solução tampão fosfato

0,1M pH 8,0 e completou-se o volume do balão com o mesmo solvente. Homogeneizou-se.

- Soluções Padrão de Trabalho – Teste Preliminar: A partir da solução padrão estoque de apramicina descrita acima foram preparadas oito soluções padrão de trabalho de apramicina, no dia do ensaio utilizando-se tampão fosfato 0,1M pH 8,0 como diluente com a finalidade de se obter as seguintes concentrações: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 ppm de apramicina.
- Solução Padrão Estoque de Apramicina – Doseamento Turbidimétrico: preparada através da pesagem de 23,3 mg de sulfato de apramicina padrão de referência, que foram quantitativamente transferidos para um balão volumétrico de 100 mL; o conteúdo do balão foi solubilizado e o volume foi completado com tampão fosfato pH 8,0. Concentração Teórica: 230 ppm de apramicina
- Soluções Padrão de Trabalho de Apramicina – Doseamento Turbidimétrico: a partir da solução padrão estoque foram preparadas cinco soluções padrão de trabalho de apramicina, no dia do ensaio utilizando-se tampão fosfato 0,1M pH 8,0 como diluente com a finalidade de se obter as seguintes concentrações: 4,4, 6,8, 10, 15 e 22,5 ppm de apramicina.
- Soluções Amostra: Foram preparadas 3 soluções amostras de cada um dos 3 lotes de apramicina pó oral solúvel através da pesagem das quantidades indicadas na tabela abaixo para um balão volumétrico de 200 mL

Tabela 6. Valores das massas pesadas para cada amostra dos 3 lotes de pó oral solúvel empregadas no doseamento de apramicina pelo método microbiológico turbidimétrico

Lote	Massa do Pó Oral (mg)		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
A	225,1	225,1	221,4
B	221,4	221,9	222,6
C	221,6	222,7	220,7

- A seguir, adicionaram-se cerca de 300 mL de água purificada para cada balão e agitou-se até completa solubilização do pó. O volume do balão foi posteriormente completado com o mesmo diluente.
- Posteriormente, foram pipetados e transferidos quantitativamente 2,0 mL de cada amostra para balão volumétrico de 100 mL; o volume de cada balão foi posteriormente completado com tampão fosfato pH 8,0.

4.2.4.2 Padronização da suspensão de *Salmonella cholerasuis*

Inicialmente, a cepa do microrganismo-teste, *Salmonella cholerasuis*, foi ativada em caldo caseína-soja e foi mantida a 5°C para conservação.

Na véspera do ensaio, o microrganismo foi repicado em estrias sobre a superfície inclinada de ágar nutriente, contido em tubo de ensaio e posteriormente submetido à incubação a 36 ± 1 °C por cerca de 24 horas.

No dia do ensaio, foi feita uma suspensão da massa celular resultante da incubação com auxílio de 5 mL de meio de cultura antibiótico estéril e agitação.

Através da diluição da suspensão microbiana concentrada com o próprio meio antibiótico, ajustou-se a transmitância para 30%, em espectrofotômetro em 580 nm previamente zerado com o próprio meio de cultura.

Para a realização do teste preliminar, três porções do meio de cultura antibiótico previamente esterilizadas foram inoculadas com a suspensão padronizada de modo a se obter 3 meios de cultura com diferentes concentrações de inóculo, a saber 0,1, 0,5 e 1,0%. Ao ser realizado o doseamento propriamente dito, uma porção previamente esterilizado do meio de cultura foi inoculada de modo que a concentração final do inóculo fosse 0,1%.

4.2.4.3 Teste preliminar

Cada uma das 8 soluções-padrão de trabalho preparadas para o teste foram ensaiadas em duplicata para cada um dos 3 tipos de inóculos de meio de cultura, contendo cada tubo 1 mL da solução padrão da concentração específica além dos 9 mL do meio inoculado. Para cada concentração de meio inoculado, foi preparado o controle positivo em duplicata, contendo 1 mL de tampão fosfato 0,1M pH 8,0 e 9,0 mL do respectivo meio inoculado em questão. Também foram preparados controles negativos para cada meio de cultura, que consistiram de 1ml de tampão fosfato 0,1M pH 8,0 adicionado de 9 mL de meio não- inoculado.

Após o período de incubação (4 horas a 37°C em banho de água), adicionou-se 0,5 mL de formaldeído a cada um dos tubos e procedeu-se à leitura de transmitância em espectrofotômetro a 580 nm.

4.2.4.4 Doseamento de apramicina pelo método microbiológico

Foram transferidas alíquotas de 1,0 mL de cada solução padrão de trabalho e de cada uma das amostras para tubos de ensaio previamente esterilizados; o ensaio foi feito em triplicata para cada solução. A seguir, foram adicionados a cada tubo 9,0 mL de meio de cultura antibiótico previamente inoculado com suspensão padronizada de *Salmonella choleraesuis* (conforme descrito em 4.2.4.2.) de modo que a concentração final do inóculo fosse 0,5%. Foram preparados 3 tubos de controle positivo contendo cada um 1,0 mL de tampão fosfato pH 8,0 e 9,0 mL de meio inoculado, e também 3 tubos de controle negativo cada um com 1,0 mL de tampão fosfato pH 8,0 e 9,0 mL de meio não-inoculado.

A seguir os tubos de ensaio foram colocados aleatoriamente em uma grade e inoculados em banho termostatzado a 37°C por 4 horas, sob agitação constante. Após o término da incubação, adicionou-se 0,5 mL de formaldeído a cada um dos tubos e procedeu-se à leitura de transmitância em espectrofotômetro a 580 nm, empregando o próprio meio antibiótico não-inoculado como branco.

A potência de apramicina foi calculada a partir da equação da reta obtida para a curva % Transmitância *versus* Log da concentração, fazendo-se as devidas transformações e considerando-se o fator de diluição.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento do método físico-químico: testes preliminares

5.1.1 Estabelecimento das condições cromatográficas preliminares

A apramicina é um composto polar, não-volátil e hidrofílico, devido à presença de vários grupos amino e hidroxila em sua estrutura; possui limitada solubilidade em álcoois alifáticos e é praticamente insolúvel em solventes orgânicos apolares. Assim sendo, torna-se necessário trabalhar com um solvente polar no preparo da amostra e, por esta razão, optou-se pelo uso de água como diluente.^[23]

Como no caso dos demais aminoglicosídeos, a separação cromatográfica pode ser feita por troca iônica ou, o mais usual, por fase reversa uso de reagentes para pareamento iônico ou ainda um tampão numa fase móvel predominantemente polar.^[1,7,47] A apramicina também não possui grupos cromóforos ou fluoróforos, sendo necessário recorrer à derivatização para sua detecção; na literatura consultada consta o uso do *o*-ftalaldeído e detecção por fluorescência.^[27,75]

O *o*-ftalaldeído (OPA) é o reagente de derivatização mais empregado na análise de aminoglicosídeos, por apresentar várias vantagens: não possui fluorescência intrínseca, o que permite que seja empregado tanto nas reações de pré quanto de pós-coluna sem a necessidade de extração dos derivados formados; a reação de derivatização é razoavelmente rápida à temperatura ambiente; não é perigoso, é de baixo custo e é estável em solução aquosa em pH < 11.5.^[51, 62, 86]

O método proposto por SWEENEY e COLEMAN^[75] para determinação do teor de apramicina em amostras biológicas emprega fase reversa utilizando uma coluna de recheio apolar (C18), fase móvel predominantemente polar (60% de água e 2 mL de ác. acético) e um pareador iônico, o octanossulfonato de sódio; emprega também derivatização pré-coluna com OPA e a detecção é feita por fluorescência com comprimento de onda de excitação de 289 nm e comprimento de onda de emissão de 390 nm.

ZHANG e colaboradores^[27] também descreveram um método para determinação de apramicina em alimentos destinados a uso veterinário baseado nas mesmas condições

cromatográficas que o método de SWEENEY e COLEMAN.^[75] Desse modo, decidiu-se iniciar o desenvolvimento do método de doseamento de apramicina por cromatografia líquida de alta eficiência adotando as mesmas condições cromatográficas utilizadas pelos autores (descritas no item 4.2.1.4) à exceção da derivatização automatizada, por não se dispor de um sistema cromatográfico com aparato para tal, e do uso da coluna C18 de 300 x 3,9 mm e 5µm, sendo utilizada outra com o mesmo preenchimento, porém com dimensões de 250 x 4,6 mm e 5µm. A reação de derivatização foi feita conforme descrito no item 4.2.1.2. e, como o rótulo do reagente de OPA pronto para derivatização recomendasse evitar exposição à luz e ao ar, tomou-se o cuidado de trabalhar com vidraria âmbar desde a reação da apramicina com o OPA até o momento das injeções.

5.1.2 Testes iniciais

Na injeção exploratória da solução padrão teste de apramicina após derivatização com o reagente de OPA pronto nas condições cromatográficas anteriormente citadas, obteve-se um pico com tempo de retenção em cerca de 22 minutos. Como foi empregado um padrão de referência de apramicina no preparo da solução e no trabalho de SWEENEY e COLEMAN^[75] obteve-se o pico da apramicina em torno de 20 minutos, concluiu-se que o pico em questão tratava-se da própria apramicina. Um branco foi preparado e injetado nas mesmas condições e não se observou pico algum com o mesmo tempo de retenção, o que confirmou a conclusão anterior. A Figura 3 abaixo traz os cromatogramas obtidos em ambos os casos.

Figura 3. Perfil cromatográfico da sol. padrão teste de apramicina (A) e do branco (B) após derivatização com reagente de OPA pronto para uso. Condições cromatográficas: fase móvel - sol. Pic B8 e acetonitrila (60:40 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna - Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), temp. ambiente; detecção - fluorescência (exc. 230nm; em. 390 nm); vol. injeção - 50 µL

O pico obtido em torno de 22 minutos caracterizado como sendo da apramicina trata-se, na verdade, do pico referente ao derivado resultante de sua reação com o OPA. De acordo com DORRESTEIJN^[86] et al. e KAALE^[87] e colaboradores, o OPA reage com aminas primárias na presença de um tiol (que, segundo o laudo do fabricante do reagente de OPA pronto para derivatização, trata-se do 2-mercaptoetanol) e, em condições ótimas (pH ideal do meio reacional, tempo de reação adequado), o equilíbrio da reação desloca-se mais no sentido de formação de derivados fluorescentes do que em direção à sua degradação ou ainda à formação de produtos secundários resultantes da hidrólise do OPA ou de sua estabilização pelo tiol. Essa reação é comumente empregada na análise de aminoglicosídeos e também de aminoácidos, já que ambos possuem aminas primárias em sua estrutura. A Figura 4 mostra um esquema simplificado da mesma.

Fonte: Kaale *et al.*, 2005

Figura 4. Esquema da reação do *o*-ftalaldeído e uma amina primária na presença de um tiol

Quando o composto a reagir com o OPA possui vários sítios de reação, como é o caso da apramicina com 4 grupos de aminas primárias, a reação pode se dar em todos os sítios, ou apenas em alguns deles, o que implica na formação de mais de um derivado além daquele de interesse.^[27,75] No caso de uma análise por CLAE, isso pode ser visível pela obtenção de outros picos no cromatograma além do pico do derivado resultante da reação completa, com uma conseqüente diminuição na área deste, o que certamente afetaria os resultados da análise. Assim, embora a estequiometria da reação OPA-apramicina seja de 4 mols de OPA para 1 mol de apramicina, decidiu-se trabalhar com uma quantidade um pouco maior de OPA para assegurar a formação do derivado resultante da reação completa.

Outro fator importante a considerar quando se realiza derivatização com OPA é o tempo da reação. De acordo com o trabalho de SWEENEY e COLEMAN^[75], a formação do derivado OPA-apramicina atinge seu máximo cerca de 33 minutos após o início da reação e, portanto, foram adotados 35 minutos como o tempo de reação após a adição do reagente de OPA à apramicina. Entretanto, após o teste inicial, foram realizadas mais injeções exploratórias consecutivas da solução de apramicina também em 75 e 135 minutos após o início da reação e verificou-se um aumento da área do pico em relação à injeção realizada após os 35 minutos da reação, como pode ser observado na Tabela 7 e na Figura 5.

Tabela 7. Variação da área do pico da apramicina conforme o tempo de reação de derivatização

Tempo da Reação (minutos)	Área do Pico referente à Apramicina (mV)
35	3.530.042
75	8.029.565
135	7.948.694

Figura 5. Sobreposição dos cromatogramas obtidos da solução padrão teste de apramicina após derivatização com OPA pronto em diferentes tempos de reação. A – 35 minutos de reação; B – 75 minutos de reação; C – 135 minutos de reação; D – Branco. Condições cromatográficas: fase móvel - sol. Pic B8 e acetonitrila (60:40 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna - Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), temperatura ambiente; fluorescência (exc. 230nm; em. 390 nm); volume de injeção - 50 µL

Com a observação dos cromatogramas da Figura 5, percebeu-se que, nas condições de trabalho, 35 minutos não foram suficientes para que as quatro aminas primárias de toda a apramicina contida no meio reagissem com o OPA. Isso é notável não somente pelo aumento da área do pico referente a ela com o tempo, mas também porque se observa paralelamente uma diminuição do pico em torno de 9 minutos, o que indica que este seja referente a um derivado resultante de uma reação incompleta de apramicina-OPA. Observou-se uma proximidade dos valores das áreas dos picos de apramicina obtidas com 75 e 135 minutos de reação, o que supõe uma estabilização do derivado fluorescente apramicina-OPA após decorrido certo tempo da mistura de reagentes.

5.1.3. Adequação do sistema cromatográfico - alterações na coluna e na composição da fase móvel

A próxima etapa foi a realização de modificações que permitissem que o pico referente à apramicina estivesse bem resolvido dos demais, fosse o mais simétrico possível e que tivesse um tempo de retenção reduzido em relação aos 22 minutos iniciais a fim de minimizar o tempo de análise. Essa etapa teve por objetivo, portanto, a adequação do sistema cromatográfico, que é feita através da avaliação de parâmetros como número de pratos teóricos, fator de cauda (*tailing factor*), fator de capacidade (k') e principalmente a resolução. Quando um método está em fase de desenvolvimento, é essencial fazer modificações em suas condições de tal forma que estes parâmetros estejam dentro de limites adequados, o que assegura a qualidade da análise e, portanto, a confiabilidade dos resultados.^[46,48,83]

De acordo com JENKE^[88], a resolução (R), como a ferramenta mais importante para testar o desempenho cromatográfico, uma vez que se relaciona diretamente com a eficiência (N), a seletividade (α) e o fator de capacidade (k'). A resolução indica a eficiência de separação de dois componentes em uma mistura e, portanto, a qualidade da análise cromatográfica. Sua determinação é feita pela comparação da distância entre 2 picos vizinhos, calculada através do tempo de retenção e da largura do pico. Os picos não estão completamente separados quando a resolução é igual ou menor que 1, indicativo de picos sobrepostos; resolução de linha de base é

alcançada com valores iguais a 1,5; valores maiores indicam uma separação completa do pico de interesse dentre os demais. Uma das metas principais ao se desenvolver um novo método analítico por CLAE é assegurar a separação completa do composto de interesse dentre os demais com o menor tempo de análise possível.

O fator de capacidade (k') é a medida do grau de afinidade que a substância apresenta para com a coluna e a fase móvel. O seu valor não deve ser muito pequeno, pois significa pouca interação do composto com a fase estacionária e/ou que a fase móvel é muito forte; por outro lado, seu valor também não pode ser muito grande pois significa que a fase móvel é muito fraca e/ou o soluto tem muita afinidade com a fase estacionária. [29, 41, 46].

O fator de separação (α) permite caracterizar a distância de separação de dois picos consecutivos e é calculado a partir da comparação do fator de capacidade. [46].

O número de pratos teóricos mede a eficiência da coluna, através do tempo de retenção obtido e da largura do pico. Quanto maior esse número, mais indicado é o empacotamento da coluna para a análise em questão, o comprimento da coluna é longo o bastante e a condição de fluxo da fase móvel é adequada. [46]

O fator de simetria (T) permite verificar a proximidade do pico cromatográfico com a forma gaussiana. Quando a assimetria é acentuada, ocorre a formação dos picos com caudas. Quando o fator de assimetria é menor que um, esta cauda é frontal. A assimetria dos picos pode interferir na precisão da metodologia, pois a altura ou a área do pico assimétrico não está linearmente relacionada com a concentração da substância analisada. [29,41,46]

Para a otimização das condições cromatográficas do método em desenvolvimento para a análise de apramicina, foram realizadas algumas injeções exploratórias com modificações na composição da fase móvel e uso de dois tipos diferentes de coluna, além da coluna que vinha sendo empregada, a Gemini C18 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m, conforme poderá ser visualizado na Tabela 8. Em cada modificação efetuada foi feita uma injeção da solução padrão de apramicina previamente derivatizada conforme descrito no item 4.2.1.2, porém, após 90 minutos de reação, em vez de 35 minutos iniciais, para garantir que a reação fosse completa com todo o OPA contido no meio e que, desta forma, se minimizasse a interferência de possíveis produtos secundários indesejados provenientes de reações parciais do OPA com alguma das 4 aminas primárias. As demais condições cromatográficas permaneceram as mesmas descritas em 4.2.1.4.

Enquanto a Tabela 8 traz as modificações efetuadas na composição da fase móvel e o tipo de coluna empregado em cada injeção, a Tabela 9 traz os resultados obtidos para os parâmetros de adequação de sistema avaliados em cada caso.

Tabela 8. Variações realizadas na composição da fase móvel e do tipo de coluna empregada para os testes de adequação do sistema cromatográfico

Injeção	Coluna	Fase Móvel		
		% ACN	% Sol. Pic B8	Fluxo (mL/min)
1	Gemini C18 - 250mm x 4,6 mm, 5 μ m	40	60	1,0
2	Gemini C18 - 250mm x 4,6 mm, 5 μ m	50	50	1,0
3	Zorbax C18 - 250mm x 4,6 mm, 4 μ m	50	50	1,0
4	Synergi Hidro C18 - 150 mm x 4,6 mm, 4 μ m	45	55	1,0

Tabela 9. Resultados obtidos para os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico em função das diferentes condições empregadas (coluna e/ou composição da fase móvel) em cada injeção

Injeção	Pico da Apramicina					
	Tempo de Retenção (min)	Área	Resolução	Fator de Simetria (T)	Fator de Capacidade (k)	Número de Pratos Teóricos
1	22,887	9.610.895	1,76	1,97	10,42	3959,46
2	13,050	13.558.189	1,60	1,91	4,22	3104,00
3	17,080	340.736	2,48	1,08	7,54	3281,82
4	11,660	7.394.057	2,76	1,44	5,14	3443,00

As Figuras 6, 7 e 8 a seguir ilustram os resultados obtidos nas injeções 2, 3 e 4 citadas nas tabelas anteriores.

Figura 6. Perfil cromatográfico de solução padrão teste de apramicina derivatizada com solução de OPA- Injeção 2. Condições. Cromatográficas: fase móvel - solução Pic B8 e acetonitrila (50:50 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), temperatura ambiente; detecção – fluorescência (exc. 230nm; em. 390 nm); volume de injeção - 50 μ L

Figura 7. Perfil cromatográfico de solução padrão teste de apramicina derivatizada com solução de OPA – Injeção 3. Condições. Cromatográficas: fase móvel - solução Pic B8 e acetonitrila (50:50 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi FusionC18 (250 mm x 4,6 mm x 4 μ m), temperatura ambiente; detecção – fluorescência (exc. 230nm; em. 390 nm); volume de . injeção - 50 μ L

Figura 8. Perfil cromatográfico de solução padrão teste de apramicina derivatizada com solução de OPA – Injeção 4. Condições Cromatográficas: fase móvel - sol. Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 μ m), temperatura ambiente; detecção – fluorescência (exc. 230nm; em. 390 nm); volume de injeção - 50 μ L

Analisando-se todos os resultados obtidos com base no que foi exposto sobre a importância dos critérios de adequação do sistema cromatográfico, sobretudo no que se refere à resolução, e nos objetivos pretendido de redução do tempo de retenção do pico da apramicina, a condição mais apropriada para se trabalhar foi aquela na qual se empregou fase móvel composta de 45% de acetonitrila e 55% de solução de Pic B8 num fluxo de 1,0 mL/min utilizando-se a coluna Synergi Hidro C18, 150 mm x 4,6 mm x 4 µm, a qual proporcionou bons valores de resolução, fator de capacidade, fator de cauda e de número de pratos teóricos e, sobretudo, menor tempo de retenção para o pico da apramicina (cerca de 11 minutos).

Decidiu-se, portanto, prosseguir com o desenvolvimento do método empregando-se essas duas novas condições de coluna e composição da fase móvel, permanecendo as demais condições cromatográficas inalteradas. Entretanto, a ocorrência de um problema com a solução de derivatização de OPA que vinha sendo empregada, fez com que os rumos do desenvolvimento do novo método fossem alterados, conforme será detalhado a seguir.

5.1.4 Substituição da solução de derivatização de OPA e alterações no modo de detecção

À medida que foram sendo realizadas mais injeções exploratórias para os testes de otimização, percebeu-se o surgimento de algumas distorções no cromatograma, tais como “ombro” no pico da apramicina e aumento de picos secundários, que foram se tornando mais evidentes a cada injeção (Figura 9).

Figura 9. Perfil cromatográfico de solução padrão teste de apramicina derivatizada com solução de OPA degradada. Condições Cromatográficas: fase móvel - sol. Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v), temperatura ambiente; fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 µm); detecção – fluorescência (exc. 230nm; em. 390 nm); volume de injeção - 50 µL

Inicialmente, suspeitou-se de uma possível degradação da apramicina, mas o problema persistiu mesmo após o uso de uma solução padrão de apramicina recém-preparada. Fez-se então um teste, utilizando-se a mesma solução de OPA pronta, porém, recém-adquirida, retirada de um frasco novo; observou-se, então, um cromatograma semelhante aos que estavam sendo obtidos anteriormente. Concluiu-se então, que as distorções que estavam sendo observadas eram consequência de uma degradação da solução de OPA pronta, mesmo mantendo-se o frasco fechado e conservado em geladeira. A Figura 10 abaixo traz uma comparação entre os perfis cromatográficos da solução padrão de apramicina derivatizada com a solução de OPA nova e com a solução degradada, respectivamente.

Figura 10. Sobreposição dos cromatogramas obtidos da solução padrão teste de apramicina após derivatização com solução OPA nova (A) e com a solução de OPA degradada (B). Condições Cromatográficas: fase móvel - sol. Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 µm), temperatura ambiente; detecção – fluorescência (exc. 230nm; em. 390 nm); volume de injeção - 50 µL

Diante do exposto, seria inviável, tanto do ponto de vista prático quanto econômico, continuar utilizando a solução de OPA adquirida pronta para uso em derivatização; o mais apropriado seria adquirir o o-ftalaldeído puro, em pó, e a partir dele preparar uma solução de derivatização para ser utilizado apenas no dia da análise.

Em consulta à literatura, dois modos de preparo de solução de derivatização com OPA foram escolhidos. O primeiro deles, por ser um método oficial, já que é descrito na Farmacopéia Britânica 2008^[28] e na Farmacopéia Americana, a USP XXXII^[85] emprega ácido mercaptoacético (ácido tioglicólico, conforme USP XXXII) como tiol. Já o segundo modo de preparo emprega o 2-mercaptoetanol (mesmo tiol do reagente de OPA pronto que vinha sendo utilizado) e foi

escolhido por estar descrito no trabalho de ZHANG^[27] e cols., que trata justamente de um método analítico por CLAE para determinação de apramicina.

Assim que o o-ftalaldeído em pó foi adquirido, as duas soluções foram preparadas, efetuou-se para ambos os casos o procedimento de derivatização descrito no item 4.2.1.3 e as amostras foram injetadas nas mesmas condições cromatográficas previamente descritas. Foram obtidos os cromatogramas das Figuras 11, 12 e 13.

Figura 11. Perfil cromatográfico da solução padrão teste de apramicina após derivatização com solução de OPA preparada segundo o artigo de ZHANG e cols (2007). Condições Cromatográficas: fase móvel - sol. Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 µm), temperatura ambiente; detecção – fluorescência (exc. 230nm; em. 390 nm); volume de injeção - 50 µL

Figura 12: Perfil cromatográfico da solução padrão teste de apramicina após derivatização com solução de OPA preparada segundo BP 2008 e USP XXXII - Detecção UV em 354 nm. Demais condições cromatográficas: fase móvel - sol. Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 µm), temp. ambiente; volume de injeção - 50 µL

Figura 13. Perfil cromatográfico da solução padrão teste de apramicina após derivatização com solução de OPA preparada segundo BP 2008 e USP XXXII - Detecção por fluorescência (exc. 230nm; em. 390 nm). Demais condições cromatográficas: fase móvel - sol. Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 µm), temperatura ambiente; volume de injeção - 50 µL

Em ambos os casos obteve-se o pico correspondente ao derivado apramicina-OPA no cromatograma referente à detecção por fluorescência, e no teste cuja derivatização foi realizada com solução de OPA preparada segundo a BP 2008^[28] e a USP XXXII^[85] (Figura 13), observou-se também o mesmo pico, em torno de 7,8 minutos, no cromatograma referente à detecção por UV/Visível (354 nm), maior e melhor definido que o pico obtido na fluorescência para as mesmas condições (Figura 12).

De um modo geral, a maioria das análises de aminoglicosídeos emprega OPA como agente de derivatização em presença de 2-mercaptoetanol e a detecção é feita por fluorescência, já que os derivados formados da reação com as aminas primárias são fluorescentes. No entanto, de acordo com o trabalho de TAWA, MATSUNAGA e FUJIMOTO^[89], bem como trabalho de revisão de ISOHERRANEN e SOBACK^[7] não se recomenda utilizar o 2-mercaptoetanol em reações para derivatização pré-coluna devido à instabilidade dos derivados formados, apesar do seu uso proporcionar maior sensibilidade na detecção.

Os mesmos autores citam que são obtidos melhores resultados com o uso do ácido mercaptopropiônico em vez do 2-mercaptoetanol, uma vez que o primeiro possui uma cadeia lateral maior. Em diversos trabalhos publicados na literatura sobre a estabilidade dos produtos de reação entre o OPA e aminas primárias em presença de um tiol, como os trabalhos de JACOBS^[90] et al. e STOBACH^[91] et al., cita-se que o tamanho da cadeia do tiol é o fator que mais afeta a estabilidade dos produtos da reação, sendo que quanto maior e/ou mais ramificada a mesma, maior a estabilidade do derivado formado devido ao impedimento estérico provocado, o que dificulta as reações de degradação do mesmo. O ácido mercaptoacético possui uma estrutura maior e mais ramificada em relação ao 2-mercaptoetanol, o que, de acordo com o exposto anteriormente, favorece a formação de derivados isoindóis mais estáveis.

Na literatura consultada, há diversos trabalhos publicados sobre determinação de aminoglicosídeos empregando derivatização com OPA em meio ao ácido mercaptoacético, o que permitiu trabalhar com detecção por UV em torno de 330 a 335 nm, como foi o caso das análises de gentamicina relatadas nos trabalhos de WEIGAND e COOMBES^[56], CHISSELL^[57] e colaboradores, ALBRACHT e DE WIT^[58] e CLAES e colaboradores^[59]. Nos trabalhos de KAALÉ e colaboradores sobre análises de gentamicina, canamicina e tobramicina por eletroforese capilar também é descrito o emprego de derivatização pré-capilar com OPA em presença de ácido mercaptoacético.^[92,93,94,95] Mesmo o método descrito na Farmacopéia

Americana (USP XXXII) ^[85] e na Farmacopéia Britânica (BP 2000) ^[96] para análise do conteúdo de gentamicina, empregam derivatização com OPA e ácido mercaptoacético com detecção por UV em 330 nm.

Considerando-se o desenvolvimento do método em questão, destinado ao doseamento de apramicina por CLAE em análises de rotina de controle de qualidade, seria bastante interessante desenvolver um método com detecção por UV, já que este tipo de detector é mais comum nos laboratórios e possui menor custo que um detector por fluorescência. Dessa forma, a próxima etapa do trabalho foi verificar a viabilidade do método por UV, otimizando as condições de detecção e preparo da amostra e comparando-o com as condições empregadas até então (uso de 2-mercaptoetanol e detecção por fluorescência).

5.2 Desenvolvimento do Método Físico-Químico: Otimização do Método

5.2.1 Otimização do modo de detecção

A primeira condição a ser otimizada foi o modo de detecção. Para tanto, realizou-se, então, nova derivatização de uma solução padrão de apramicina com a solução de derivatização de OPA II em presença de ácido mercaptoacético (conforme item 4.2.1.3) e, passados 60 minutos da reação, foi feita uma varredura no UV, na qual foram verificados dois comprimentos de onda de absorção máxima: 236 e 332 nm. O espectro obtido pode ser visto na Figura 14.

Figura 14: Espectro de varredura na região do UV da solução padrão teste de apramicina derivatizada com solução de OPA preparada em presença de ácido mercaptoacético, conforme BP 2008 e USP XXXII

A seguir, realizou-se uma nova derivatização da solução padrão teste de apramicina conforme procedimento descrito no item 4.2.1.3. e, logo após, foram feitas duas corridas cromatográficas nas mesmas condições dos testes de otimização que vinham sendo realizados até então, porém, com detecção por UV, uma delas em 332 nm e a outra em 236 nm. Foram obtidos os cromatogramas das Figuras 15 e 16.

Figura 15: Perfil cromatográfico da solução padrão teste de apramicina após derivatização com solução de OPA preparada segundo BP 2008 e USP XXXII - Detecção UV em 332 nm. Demais condições cromatográficas: fase móvel – solução de Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 µm), temperatura ambiente; volume de injeção - 50 µL

Figura 16: Perfil cromatográfico da solução padrão teste de apramicina após derivatização com solução de OPA preparada segundo BP 2008 e USP XXXII - Detecção UV em 236 nm. Demais condições cromatográficas: fase móvel - sol. Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 µm), temperatura ambiente; volume de injeção - 50 µL

Como pôde ser visto nas Figuras 15 e 16, em ambos os casos foi obtido o pico referente ao derivado apramicina-OPA, sendo que a área do pico obtido com detecção em 236nm (8608128) foi até maior do que a área do mesmo obtida em 332nm (2265741); entretanto, também ficaram ressaltados neste cromatograma diversos picos secundários entre 2 e 4 minutos. Dessa forma, optou-se por trabalhar com detecção em 332 nm, que também está de acordo com os comprimentos de onda utilizados em doseamentos de aminoglicosídeos empregam OPA em presença de ácido mercaptoacético, conforme já exposto e verificado na literatura consultada. [57,58,59,8592,93,94,95,96].

É importante ressaltar que também foi preparado e um branco, conforme item 4.2.1.3., derivatizado e injetado nas mesmas condições da solução padrão teste de apramicina, com detecção por UV em 332 nm. No cromatograma obtido, como mostra a Figura 17 abaixo, não se observou nenhum outro pico co-eluinto junto com o pico referente à apramicina.

Figura 17: Perfil cromatográfico do branco após derivatização com solução de OPA preparada segundo BP 2008 e USP XXXII - Detecção – UV em 332 nm. Demais condições cromatográficas: fase móvel - sol. Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 µm), temperatura ambiente; volume de injeção - 50 µL

Embora o emprego de solução de derivatização de OPA em meio ao ácido 2-mercaptoacético com detecção por UV estivesse se apresentando como a melhor opção frente ao uso de solução de OPA preparada em meio ao 2-mercaptoetanol e uso de detecção por fluorescência, teria de se considerar em ambos os casos o tempo de formação e a estabilidade do derivado apramicina-OPA, fatores cruciais na aplicação prática do método.

Dessa forma, o próximo passo foi comparar a estabilidade do derivado apramicina-OPA obtido tanto em presença do 2-mercaptoetanol quanto em presença do ácido 2-mercaptoacético. Para tanto, derivatizou-se uma solução padrão teste de apramicina com a solução de derivatização de OPA com 2-mercaptoetanol e outra solução padrão de apramicina com a solução de OPA com ácido 2-mercaptoacético conforme item 4.2.1.3, porém, fazendo-se injeções sucessivas a cada 20 minutos a contar do início da reação, durante um período de 5 horas. No primeiro caso a detecção foi feita por fluorescência (comp. onda excitação: 239 nm; comp. onda emissão: 380 nm) e no segundo, por UV (comp. onda em 332 nm). Com as áreas obtidas em cada injeção, construiu-se um gráfico *Área versus Tempo* para cada caso, que foram posteriormente comparados, conforme pode ser visto na Figura 18.

Figura 18: Gráfico comparativo área x tempo da estabilidade do derivado apramicina-OPA com uso de 2-mercaptoetanol e detecção por fluorescência e com o uso de ác. mercaptoacético e detecção por UV

Analisando-se os gráficos obtidos percebe-se que o comportamento dos derivados apramicina-OPA em presença de 2-mercaptoetanol e do ác. mercaptoacético estão em conformidade com o que está exposto na literatura a respeito de sua estabilidade. Percebe-se que o derivado apramicina-OPA atinge seu máximo de formação (observado pela obtenção da área máxima) mais rapidamente em presença do 2-mercaptoetanol (40 minutos), porém, seu decaimento com o passar do tempo é também mais rápido em relação ao derivado apramicina-OPA obtido em presença do ácido 2-mercaptoacético; este último demora cerca de 1 hora para atingir o seu máximo de formação, e ainda se mantém estável por mais 3 horas, apresentando, portanto, decaimento mais lento, o que se constitui uma vantagem para emprego em análises de rotina.

5.2.2 Escolha do melhor procedimento de derivatização

Antes de se decidir adotar definitivamente o método por CLAE com detecção por UV, foi necessário verificar se o procedimento de derivatização empregado estava sendo adequado. De acordo com a literatura consultada, os procedimentos de derivatização dos métodos que empregam OPA com ácido mercaptoacético para análise de antibióticos aminoglicosídeos, são feitos com a adição de pequena quantidade de metanol ou isopropanol à alíquota da amostra a ser derivatizada e, após a adição da solução de derivatização, aquecimento (geralmente a 60°C, podendo ser também a 90°C e a 40°C) por um período de 5 a 15 minutos, seguido de resfriamento e injeção da amostra. Decidiu-se, portanto, testar se haveria ou não uma melhora do método em questão com outro procedimento de derivatização e, para tal, foram escolhidos dois métodos oficiais de derivatização com OPA em presença de ácido mercaptoacético (mesma solução que vinha sendo testada) para determinação do conteúdo de gentamicina, um descrito pela USP XXXII^[85] e o outro descrito pela BP 2000.^[96] No primeiro caso emprega-se adição de isopropanol antes da derivatização, e no segundo, adição de metanol; ambos os métodos empregam aquecimento a 60°C durante 15 minutos seguido de resfriamento e posterior injeção da amostra.^[42,43]

Novamente foram preparadas duas soluções-padrão teste de apramicina, sendo uma delas derivatizada conforme método USP^[85] e a outra conforme método BP^[96], ambos descritos no item 4.2.1.3. Ambas as soluções foram injetadas sucessivamente a cada 20 minutos (desde o resfriamento) por um período de 5 horas, com as mesmas condições cromatográficas empregadas até então. As Figuras 19 e 20 mostram os perfis cromatográficos de áreas máximas obtidos para cada solução padrão teste de apramicina utilizando-se o método USP XXXII^[85] e o método BP 2000^[96], respectivamente.

Figura 19: Perfil cromatográfico da solução padrão teste de apramicina derivatizada com OPA e ácido mercaptoacético conforme USP XXXII (aquecimento e uso de isopropanol como diluente). Condições Cromatográficas: fase móvel - sol. Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 µm), temperatura ambiente; detecção – UV em 332 nm; volume de injeção - 50 µL

Figura 20: Perfil cromatográfico da solução padrão teste de apramicina derivatizada com OPA e ácido mercaptoacético conforme BP 2000 (aquecimento e uso de metanol como diluente). Condições Cromatográficas: fase móvel – solução de. Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 μ m), temperatura ambiente; detecção – UV em 332 nm; volume de injeção - 50 μ L

Posteriormente foram plotados os gráficos *Área versus Tempo* para cada caso e também foi feita uma comparação com o mesmo gráfico anteriormente obtido no qual a derivatização também havia sido feita com OPA e ácido mercaptoacético, porém, sem aquecimento e utilizando-se somente água como diluente. A Figura 21 abaixo traz essa comparação.

Figura 21: Gráfico comparativo área x tempo para a solução padrão teste de apramicina derivatizada com OPA e ácido mercaptoacético em meio a água purificada, isopropanol e metanol

Pela análise dos gráficos obtidos, percebe-se que quando se utiliza o isopropanol como diluente atinge-se um máximo de formação do derivado apramicina-OPA somente após 3 horas do início da reação; a estabilidade do derivado apramicina-OPA formado nessas condições é menor se comparada ao uso de água sem aquecimento, já que se observa uma faixa menor em que as áreas se mantêm em um valor relativamente próximo da área máxima e também há um decaimento mais rápido. Já no caso do uso de metanol e de aquecimento, atingiu-se o máximo da formação do derivado apramicina-OPA cerca de 5 horas (300 minutos) após o início da análise e, embora seja observada certa estabilidade com valores de áreas próximos ao valor da área máxima em torno de 220 a 340 minutos, não seria viável utilizar este procedimento pelo tempo que seria necessário esperar para que a reação entre apramicina e OPA atinge seu máximo de formação do derivado de interesse.

Ao se observar os cromatogramas das Figuras 19 e 20 (referentes ao uso de isopropanol e metanol como diluentes, respectivamente) percebe-se que há um pico eluindo próximo ao pico referente à apramicina (em torno de 6,5 minutos), o que tende a prejudicar a resolução do mesmo,

sobretudo no caso do uso do isopropanol, como pode ser visto na Figura 19. Comparando-se os perfis cromatográficos da solução padrão teste de apramicina derivatizada conforme USP XXXII^[85] e BP 2000^[96], com o perfil cromatográfico da mesma solução derivatizada em meio à água e temperatura ambiente, percebe-se que não houve vantagens que justificassem a mudança do procedimento de derivatização que vinha sendo utilizado.

Assim sendo, optou-se por trabalhar com a solução de derivatização de OPA em presença de ácido mercaptoacético preparada segundo Farmacopéia Britânica 2008^[28] e Farmacopéia Americana (USP) XXXII^[85], mantendo-se o mesmo procedimento de derivatização que vinha sendo usado antes (uso da água como diluente e reação à temperatura ambiente, ao abrigo da luz) e detecção por UV em 332nm. As demais condições cromatográficas do método em desenvolvimento permaneceram inalteradas.

5.2.3 Verificação da seletividade em relação à tobramicina

Antes de se prosseguir com a otimização do método de análise de apramicina por CLAE, foi necessário avaliar se a resposta por ele produzida era devida somente à apramicina ou se poderia haver interferência de algum outro composto, sobretudo, da mesma família.

Conforme exposto anteriormente, as condições empregadas no método de análise proposto baseiam-se não somente em métodos destinados à análise de apramicina, mas também em métodos de determinação de outros aminoglicosídeos e, considerando-se que possuem muitas características estruturais e químicas em comum, um método de análise destinado à análise de um deles poderia também ser aplicado para a análise de outro. Dessa forma, é de grande importância saber se, mesmo que um método seja capaz de produzir respostas para compostos semelhantes, essas respostas são distintas entre si, ou seja, se o método é seletivo.

Para avaliar a seletividade do método em questão é necessário medir o composto de interesse na presença de outro(s) relacionado(s) ou estruturalmente semelhante a este. Assim como a apramicina, a tobramicina é também produzida por uma cepa de *Streptomyces tenebrarius*, sendo chamada fator 6 do complexo da nebramicina; enquanto que a apramicina se

constitui no fator 2 do mesmo complexo. Há, portanto, possibilidade de contaminação da apramicina com tobramicina, mesmo que em quantidades pequenas, de modo que um método destinado à análise de qualquer uma das duas deve ser capaz de produzir respostas distintas para cada substância. Considerando-se este fato, bem como a impossibilidade de se testar a apramicina frente a todos os aminoglicosídeos, escolheu-se utilizar a tobramicina, a mais semelhante a ela em termos de características físico-químicas e de síntese. ^[47]

Prepararam-se soluções padrão teste de apramicina e tobramicina conforme descrito no item 4.2.1.1., e as mesmas foram submetidas à derivatização individualmente e também misturadas em um mesmo balão volumétrico de 10 mL de acordo com o procedimento de derivatização com solução de OPA e ácido mercaptoacético do item 4.2.1.3. Como este teste era mais de caráter qualitativo do que quantitativo, ou seja, a maior preocupação maior estava em se verificar a separação ou não entre apramicina e tobramicina, não houve grande preocupação com o tempo da reação de derivatização no sentido de se atingir o máximo da formação dos derivados apramicina-OPA e tobramicina-OPA.

As três soluções (mistura (apramicina+tobramicina), apramicina e tobramicina) foram injetadas e obtiveram-se os cromatogramas das Figuras 22, 23 e 24.

Figura 22: Perfil cromatográfico da solução padrão teste de apramicina + tobramicina derivatizada com OPA e ácido mercaptoacético. Condições. Cromatográficas: fase móvel – solução de Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 μ m), temperatura ambiente; detecção – UV em 332 nm; volume de injeção - 50 μ L

Figura 23: Perfil cromatográfico da solução padrão teste de apramicina derivatizada com OPA em meio a ácido mercaptoacético. Condições Cromatográficas: fase móvel - sol. Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 μ m), temperatura ambiente; detecção – UV em 332 nm; volume de injeção - 50 μ L

Figura 24: Perfil cromatográfico da solução padrão teste de tobramicina derivatizada com OPA e ácido mercaptoacético. Condições Cromatográficas: fase móvel - sol. Pic B8 e acetonitrila (55:45 v/v); fluxo - 1,0 mL/min; coluna – Synergi Hidro C18 (150 mm x 4,6 mm x 4 µm), temperatura ambiente; detecção – UV em 332 nm; volume de injeção - 50 µL

O cromatograma da mistura apramicina+tobramicina mostra uma nítida separação entre o pico da apramicina e os dois outros picos referentes à tobramicina (um em 6,98 minutos e o outro em 9,73 minutos). O trabalho de LAI e SHEEHAN^[61] sobre determinação de tobramicina com derivatização pré-coluna com OPA com detecção por UV e por fluorescência também relata a obtenção de dois picos referentes à formação de dois derivados.

A comparação entre os três cromatogramas, mostrada logo abaixo na Figura 25, foi feita para confirmar que não há, portanto, interferência da tobramicina com o pico da apramicina nas condições de análise empregadas no método em questão.

Figura 25: Sobreposição e comparação dos cromatogramas das soluções padrão utilizadas no teste de seletividade: A – mistura apramicina + tobramicina; B- tobramicina; C- apramicina.

5.2.4 Definição da concentração de OPA em relação à concentração de apramicina

Conforme já anteriormente citado nos testes preliminares, umas das preocupações iniciais para se garantir que o método desenvolvido produzisse resultados confiáveis foi trabalhar com uma concentração de OPA que garantisse uma reação completa com a apramicina, de modo que o derivado apramicina-OPA gerado fosse um produto resultante de uma reação completa com as quatro aminas primárias da apramicina. Optou-se, então, por trabalhar com um excesso de OPA de 5 vezes mais a quantidade necessária para reagir com a quantidade de apramicina contida na amostra a ser derivatizada. Entretanto, considerando-se que os derivados isoindóis se degradam mais rapidamente quando na presença de um excesso de OPA conforme consultado nos trabalhos de JACOBS^[90] et al, STOBAGH^[91] et al. e DORRESTEIJN^[86] et al., havia ainda que se considerar se a concentração de OPA que estava sendo utilizada era apropriada.

Outro fator igualmente importante para se garantir a reação completa da apramicina com o OPA é o tempo de reação pois, conforme observado nos testes anteriores, a área do pico referente à apramicina tende a aumentar com o passar do tempo (formação progressiva do derivado apramicina-OPA), estabilizar-se em torno de um valor máximo durante certo período (formação do derivado resultante da reação completa apramicina-OPA) e depois diminuir, indicando decomposição do derivado formado.

A etapa final da otimização do método consistiu, portanto, em estabelecer as condições ótimas de tempo de reação e de concentração de OPA a serem empregados para garantir resultados confiáveis em tempo hábil para que o método pudesse ser empregado com sucesso em análises de rotina.

Com base em teste anterior, no qual a solução de apramicina foi derivatizada com solução de OPA e ácido mercaptoacético (em água e à temperatura ambiente) e logo após injetada sequencialmente em intervalos de vinte minutos por um período de 5 horas, observou-se que a área máxima obtida ocorreu em 90 minutos, ou seja, 1 hora e meia após o início da reação (início da derivatização); também foi verificado que no período entre 60 e 255 minutos, os valores das áreas encontram-se próximos ao valor máximo e que o desvio padrão entre eles foi cerca de 0,9%, o que indica estabilidade do derivado formado e, portanto, o intervalo de tempo adequado para se trabalhar em uma análise de quantificação da apramicina. Restava saber se este tempo necessário para obtenção de uma resposta máxima seria o mesmo com uma variação na proporção da concentração de OPA em relação à de apramicina.

Para tanto, uma solução padrão teste de apramicina foi derivatizada três vezes de maneira que ao final da derivatização fossem obtidas três soluções, cada uma delas com diferentes proporções da concentração de OPA em relação à de apramicina: a primeira solução possuía concentração final de OPA 2,5 vezes maior que a de apramicina, na segunda a concentração de OPA era 10 vezes maior e na terceira solução a concentração final de OPA foi 50 vezes maior que a de apramicina. Embora variassem as proporções e, portanto, a concentração de OPA, a concentração de apramicina foi mantida constante (a mesma da solução final após derivatização dos testes anteriores – aprox. 0,03 mg/mL). Logo após o início da derivatização, cada solução também foi injetada sequencialmente a cada 15 minutos por um período de 300 minutos.

Os resultados obtidos foram avaliados através da construção do gráfico Área x Tempo para cada uma das três proporções de OPA e posterior comparação das curvas entre si e com aquela anteriormente obtida em teste anterior no qual a proporção entre a concentração de OPA e de apramicina na solução final era 5. A Figura 26 e a Tabela 10 trazem, respectivamente, a comparação entre os gráficos construídos e os resultados das áreas obtidas em cada caso ao longo do tempo de reação.

Figura 26: Gráfico comparativo Área x tempo de formação e decaimento do derivado apramicina-OPA com o uso de diferentes proporções de concentração de OPA em relação à de apramicina

Tabela 10. Áreas do pico referente à apramicina obtidas ao longo de 300 minutos de reação após sucessivas injeções de cada uma das quatro soluções padrão com diferentes proporções entre as concentrações finais de OPA e de apramicina

Tempo de reação (min)	Áreas Obtidas			
	2,5 X OPA	5 X OPA	10 X OPA	50 X OPA
30	1.970.477	3.838.581	3.935.943	4.199.962
45	3.023.793	4.282.031	4.252.675	4.204.633
60	3.476.227	4.413.973	4.280.156	4.175.696
75	3.751.966	4.441.489	4.359.043	4.147.604
90	3.933.873	4.450.103	4.394.793	4.106.002
105	4.044.536	4.443.950	4.408.124	4.072.117
120	4.120.844	4.430.927	4.392.180	4.039.629
135	4.166.854	4.423.036	4.372.822	4.003.979
150	4.191.270	4.400.021	4.352.548	3.971.189
165	4.205.535	4.383.765	4.325.626	3.941.061
180	4.241.597	4.378.119	4.312.323	3.930.076
195	4.232.323	4.360.000	4.283.124	3.903.988
210	4.223.696	4.341.095	4.260.819	3.872.619
225	4.216.780	4.327.888	4.241.039	3.840.949
240	4.205.674	4.312.182	4.216.069	3.807.607
255	4.193.476	4.291.128	4.193.929	3.772.891
270	4.178.649	4.274.628	4.169.873	3.741.658
285	4.158.018	4.260.854	4.145.924	3.698.782
300	4.147.209	4.237.984	4.125.412	3.631.906
Média*	4.180.461,50	4.358.509,61	4.264.338,00	4.014.474,07
DPR (%)*	1,24	1,61	1,60	1,83

* A Média e o Desvio Padrão Relativo (DPR) referem-se à faixa dos valores na cor vermelha, incluindo a faixa dos valores de cor azul e os valores de cor rosa.

A Tabela 10 foi construída para facilitar a interpretação dos resultados. Os valores na cor rosa foram os valores de área máxima que indicam, portanto, o tempo no qual a formação do derivado apramicina-OPA foi máxima. Os valores na cor azul são a faixa na qual os valores das áreas representaram cerca de 98% em relação à área máxima. Já a faixa de valores na cor vermelha, abrange também os valores das áreas que variaram em até um mínimo de 95% em relação à área máxima; o desvio padrão relativo foi calculado considerando-se os valores contidos nesta última faixa.

Ao se analisar os resultados, verifica-se que com a proporção de 2,5 vezes a concentração de OPA, obteve-se o menor desvio padrão relativo para a faixa de valores de 95% a 100% em relação às outras proporções. Entretanto, esta proporção foi também a que apresentou maior tempo de formação máxima do derivado apramicina-OPA, 180 minutos, indicativo de que não é a mais adequada, considerando-se a aplicação do método para análises de rotina.

O teste realizado com concentração de OPA 50 vezes maior que a de apramicina foi o que atingiu a formação máxima do derivado apramicina-OPA mais rapidamente; contudo, da mesma forma que a reação acontece com maior velocidade e, portanto, em menor tempo, o derivado também começa a decair mais rápido, devido ao excesso de OPA. De acordo com TAWA^[91], a presença de OPA em excesso gera uma deestabilização do derivado, que tende a se degradar. Essa opção foi, portanto, descartada.

Já com as proporções de 5 e 10 vezes a concentração de OPA em relação à de apramicina, o comportamento de formação e decaimento do derivado apramicina-OPA foi semelhante, bem como o tempo de formação máxima do derivado e o desvio padrão relativo para a faixa de valores em vermelho. Entretanto, quando se trabalha com uma concentração de OPA 5 vezes maior que a de apramicina, a faixa de valores entre 95 a 100% da área máxima é maior do que quando se trabalha com uma concentração de OPA 10 vezes maior. Mais importante ainda que esta faixa é considerar a faixa dos valores em azul, que representam valores bem próximos ao valor da área máxima, o que significa maior estabilidade do derivado formado; no caso da proporção de 10 vezes OPA, esta faixa vai de 90 a 150 minutos (60 minutos), e no caso da proporção de 5 vezes OPA, a mesma se situa entre 60 e 135 minutos, ou seja 75 minutos.

Concluiu-se então que, para as condições em que o método foi desenvolvido, o melhor é trabalhar com uma concentração de OPA 5 vezes maior que a concentração de apramicina.

Conclui-se também que; embora o tempo necessário para obtenção da resposta máxima seja de 1 hora e meia (90 minutos), é possível aguardar uma hora após o início da reação e trabalhar com a solução por um período de até 5 horas com DPR menor que 2%, que geralmente é limite máximo de variação permitido entre um conjunto de injeções consecutivas da mesma solução. Todavia, é aconselhável trabalhar dentro da faixa dos valores em azul, uma vez que a diferença entre eles e a área máxima é, no máximo, 1%, enquanto que na faixa azul pode ser de até 5%, o que se torna bastante significativo quando se considera a exatidão do resultado. Dessa forma, recomenda-se trabalhar com a solução entre uma até no máximo duas horas e 15 minutos após o início da reação.

Com este último teste finalizou-se a etapa de desenvolvimento e otimização do método cujas condições nominais, após todos os ajustes efetuados, ficaram as seguintes:

➤ Condições cromatográficas:

- Fase Móvel (Bomba A) – Solução de Octanossulfonato de Sódio (Pic B8) – 55%
- Fase Móvel (Bomba B) – Acetonitrila – 45%
- Fluxo - 1,0 mL/minuto
- Comprimento de Onda de Detecção - UV: 332 nm
- Volume de Injeção: 50 µL
- Temperatura: Ambiente
- Coluna: Synergi Hydro C18, 150 mm x 4,6 mm x 4 µm

➤ Condições de preparo da amostra e da derivatização:

- Diluente: Água purificada
- Solução de derivatização de *o*-ftalaldeído (OPA) preparada conforme BP 2008^[28] e USP XXXII^[85]
- Proporção entre a concentração final de OPA em relação à de apramicina após derivatização: 5 vezes
- Condições da reação de derivatização: em meio à água, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente (prevenção de degradação do OPA)

- Tempo máximo de reação após derivatização: 1 hora e meia
- Tempo hábil para se trabalhar após o início da reação: aproximadamente 2 horas

A Figura 27 apresenta uma comparação entre os cromatogramas de uma solução padrão teste de apramicina e uma solução-amostra preparados e derivatizados conforme descritos nos itens 4.2.1.1 e 4.2.1.3, respectivamente nas condições nominais acima descritas.

Figura 27: Sobreposição dos cromatogramas da solução padrão teste de apramicina e da solução amostra preparadas, derivatizadas e injetadas nas condições nominais do método recém-desenvolvido

Conforme se pode observar, a amostra apresenta perfil cromatográfico bastante semelhante ao do padrão, indicativo de que, nas condições cromatográficas de análise, não há substâncias na mesma que interfiram com o composto de interesse, a apramicina. É importante citar que as concentrações teóricas das soluções teste padrão e amostra são próximas entre si (aproximadamente 0,03 mg/mL).

A seguir, iniciou-se a validação do método para realmente confirmar se o mesmo era adequado para a finalidade pretendida, ou seja, o doseamento de apramicina por CLAE.

5.3 Método físico-químico: validação do método analítico por CLAE

5.3.1. Robustez

Conforme já anteriormente citado, a robustez de um método avalia o quão resistente o mesmo é diante de pequenas e deliberadas variações. O teste de robustez permite avaliar se as condições estabelecidas para o método recém-desenvolvido são, de fato, as mais apropriadas e como a performance do método é afetada quando as mesmas são modificadas; em caso de alterações significativas, o método teria de ser otimizado novamente. Portanto, para confirmar se as condições anteriormente estabelecidas eram de fato as melhores para se trabalhar, decidiu-se iniciar a validação pela robustez.

Considerando-se os parâmetros cujas pequenas mudanças deliberadas poderiam resultar em variação da resposta do método em questão, tem-se: a composição da fase móvel (porcentagem de solvente orgânico, quantidade de ácido acético empregada no preparo da solução de Pic B8), temperatura da coluna no sistema cromatográfico, uso de coluna de lote diferente e proporção da concentração final de OPA em relação à de apramicina. As alterações realizadas e as condições normais de análise encontram-se na Tabela 11 abaixo.

Uma solução padrão de apramicina preparada e derivatizada com solução de OPA conforme descrito nos itens 4.2.2.2 e 4.2.2.7 foi injetada 3 vezes consecutivamente nas condições nominais do método e em cada uma das novas condições conforme a modificação efetuada. As Figuras 28 a 32 abaixo trazem as comparações entre o cromatograma obtido nas condições nominais do método e os cromatogramas obtidos nas condições modificadas para cada parâmetro avaliado.

Tabela 11: Relação das condições nominais e das modificações efetuadas para cada parâmetro cromatográfico nos testes de avaliação da robustez

Parâmetros	Condições	Modificação(ões)
	Nominais	Efetuada(s)
Composição da Fase Móvel		
1- Porcentagem de solvente orgânico adicionada	Solução de Pic B8: ACN (55%:45%)	Solução de Pic B8: ACN (57%:43%) e Solução de Pic B8: ACN (53%:47%)
2- Volume de ácido acético adicionado à solução de Pic B8	20 mL	18 mL
Proporção OPA/Apramicina		4 OPA:1 Apra e 6 OPA:1 Apra
Coluna	Synergi Hydro C18, 150 x 4,6 mm, 4 µm;	Synergi Hydro C18, 150 x 4,6 mm, 4 µm;
	SN: 100988-12	SN: 394129-13
Temperatura da Coluna	Ambiente (25 °C)	30 °C

Figura 28. Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de apramicina obtidos nas condições nominais, mas com diferentes composições de fase móvel (FM). A - FM condições nominais; B - FM com 47% ACN e 53% Solução Pic B8; C - FM com 43% ACN e 57% Solução Pic B8

Figura 29. Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de apramicina obtidos nas condições nominais, com diferentes preparos de fase móvel (FM). A- FM condições nominais; B- FM com solução Pic B8 preparada com 18 mL ác. acético

Figura 30. Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de apramicina obtidos nas condições cromatográficas nominais, mas com diferentes proporções entre as concentrações de OPA/Apramicina. A – 5 X OPA; B – 4 X OPA; C – 6 X OPA

Figura 31. Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de apramicina obtidos nas condições nominais, mas com diferentes temperaturas da coluna. A- FM condições nominais; B- FM com solução Pic B8 preparada com 18 mL ácido acético

Figura 32. Comparação dos perfis cromatográficos da solução padrão de apramicina obtidos nas condições nominais, com diferentes lotes de coluna. A- coluna 1 (cond. nominal); B- coluna 2

A Tabela 12 abaixo traz todos os resultados obtidos, relacionando os valores médios da razão área do pico/concentração de apramicina bem como dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico para as 3 injeções efetuadas nas condições nominais e em cada uma das condições com parâmetros modificados. Foi necessário dividir a área do pico referente à apramicina para uniformizar os resultados das área obtidas para que as mesmas pudessem ser comparadas, pois, com a modificação da proporção da concentração de OPA em relação à de apramicina, a concentração desta última variou ocasionando obtenção de áreas distintas daquela obtida para o pico de apramicina nas condições nominais (conforme se verifica na Fig.30), o que poderia causar uma interpretação equivocada dos resultados obtidos.

Baseando-se na Tabela 12, foi construído o gráfico de dispersão da Figura 33 que relaciona todas as variações entre as injeções realizadas para as oito diferentes condições.

Tabela 12: Resultados médios da razão valor da área do pico de apramicina/concentração, bem como dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico obtidos para as injeções da solução padrão de apramicina realizadas nas condições nominais do método e em cada uma das condições modificadas

Condição	Modificações	Tempo de Retenção (min)	Área/ Concentração	Fator de Simetria	Fator de Capacidade	Pratos Teóricos
1	Condições Nominais	7,79	125532625,00	1,09	4,64	3987,7
Composição da Fase Móvel						
2	53% Solução de Pic B8: 47% ACN	5,89	126853950,00	1,08	3,26	3815,3
3	57% Solução de Pic B8: 43% ACN	10,75	126234883,33	1,09	6,79	4068,3
4	Solução de Pic B8 c/ 18 mL de Ác. Acético	7,84	122134425,00	1,08	4,68	4034,7
Proporção de OPA/Apramicina						
5	4X	7,44	119501743,00	1,37	4,39	3369
6	6X	7,48	120716446,70	1,15	4,42	4126
7	Temperatura de 30°C	7,09	121238741,70	1,1	4,14	4369,7
8	Coluna 2	8,16	124853883,00	1,29	4,91	3641,3

Figura 33. Gráfico de dispersão dos resultados médios obtidos de área do pico/concentração de apramicina para as 3 injeções efetuadas nas 8 condições cromatográficas estudadas

O gráfico da Figura 33, que indica a dispersão dos valores médios obtidos em cada condição, permite observar que mesmo efetuando-se pequenas modificações nos parâmetros do método, não se observa uma variação significativa da resposta obtida em relação àquela fornecida quando se trabalha nas condições nominais. É importante frisar também que as barras verticais de erro do gráfico indicam o limite de variação para cada condição considerando-se um valor máximo de desvio padrão de 1%; como os valores estão bem próximos ao centro das barras, a variação foi mínima, indicativo de que o desvio padrão entre os resultados é baixo. Concluiu-se, então, que o método não é afetado por pequenas modificações deliberadas nos parâmetros analíticos, ou seja, é um método robusto.

É importante notar que a robustez do método foi avaliada não somente em função das áreas do pico da apramicina, mas também em função dos parâmetros que expressam a adequação do sistema cromatográfico para análise. De acordo com os valores obtidos para fator de capacidade, fator de cauda e número de pratos teóricos (Tabela 12), percebe-se não somente que mudanças deliberadas não causam variações significativas na adequação do sistema cromatográfico, mas também que o mesmo se manteve estável ao longo o tempo, o que garante boa conduta cromatográfica do método.

5.3.2 Especificidade/seletividade

Considera-se que um método é específico quando produz resposta apenas para um único componente de interesse. Como o método em questão possui características comuns a outros métodos para análise de aminoglicosídeos e, portanto, não é específico para a apramicina; optou-se então, por utilizar o termo *seletividade*, que é mais apropriado para casos como esse.^[48]

Para que o método em questão seja considerado seletivo, ele deve ser capaz de produzir uma resposta característica para a apramicina mesmo frente a outros compostos estruturalmente semelhantes e frente à substâncias relacionadas e/ou produtos de degradação provenientes dela ou mesmo de constituintes da matriz da amostra a ser analisada.

Durante a etapa de otimização, já foi verificado que o método é seletivo para a apramicina quando esta se encontra em presença da tobramicina, que é o aminoglicosídeo que mais se assemelha a ela (ver item 5.2.3). Faltava avaliar o comportamento do método frente às substâncias relacionadas e aos seus possíveis produtos de degradação. Como não se dispunha dos mesmos, quatro soluções padrão de apramicina foram individualmente submetidas às condições de degradação forçada (hidrólises ácida e alcalina, oxidação e degradação térmica) por um período de uma e de duas horas. O mesmo procedimento foi feito com soluções contendo apenas o placebo, ou seja, somente o excipiente contido na forma farmacêutica em estudo (pó oral solúvel), o bicarbonato de sódio. A degradação forçada teve por finalidade gerar possível(is) produto(s) de degradação e verificar se a resposta de tal(is) substância(s) é capaz de interferir com a resposta do composto de interesse, que no caso, é a apramicina.

A avaliação da seletividade do método foi feita através da comparação dos cromatogramas obtidos para a solução de apramicina e para a solução placebo em cada condição de degradação forçada com o cromatograma da solução padrão de trabalho 100% de apramicina (a mesma utilizada na construção da curva padrão 1) não degradada (com concentração teórica de apramicina igual à das soluções submetidas à degradação forçada), e o cromatograma obtido para o diluente (água purificada), todos derivatizados e injetados nas mesmas condições cromatográficas. A Tabela 13 abaixo mostra os resultados obtidos e as Figuras 34 a 37 mostram as comparações cromatográficas para cada tipo de degradação.

Tabela 13. Teste de Seletividade: Áreas do pico referente à apramicina em cada tipo de degradação forçada e comparação das mesmas com a área obtida para o mesmo pico na solução padrão não-degradada

Tipo de Degradação	Área pico Apramicina (média 3 injeções)	% Área média do pico da apramicina em relação à área obtida para a solução padrão 100%*
Hidrólise Ácida - 1 hora	--	--
Hidrólise Ácida - 2 horas	--	--
Hidrólise Alcalina - 1 hora	1.123.646,67	23,08
Hidrólise Alcalina - 2 horas	1.561.654,33	32,07
Oxidação - 1 hora	--	--
Oxidação - 2 horas	--	--
Temperatura 100 °C - 1 hora	4.764.089,67	97,84
Temperatura 100 °C - 2 horas	4.581.186,33	94,09

* A média das áreas para as 3 injeções do padrão de 100% foi de 4869052.7

Figura 34. Comparação entre os perfis cromatográficos da solução de apramicina e solução placebo após uma hora de hidrólise ácida com os perfis cromatográficos da solução padrão de trabalho 100% apramicina e do diluente. Condições Nominais. A – Solução padrão 100% apramicina; B- Solução de apramicina após hidrólise ácida; C – Solução placebo após hidrólise ácida; D – Diluente

Figura 35. Comparação entre os perfis cromatográficos da solução de apramicina e solução placebo submetidas à 2 horas de hidrólise alcalina com os perfis cromatográficos da solução padrão de trabalho 100% apramicina e do diluente. Condições Nominais. A – Solução padrão 100% apramicina; B- Solução apramicina após hidrólise alcalina; C – Solução placebo após hidrólise alcalina; D - Diluente

Figura 36. Comparação entre os perfis cromatográficos da solução de apramicina e solução placebo submetido a uma hora de oxidação com os perfis cromatográficos da solução padrão trabalho 100% apramicina e do diluente. Condições Nominais. A – Solução padrão 100% apramicina; B- Solução de apramicina após hidrólise. alcalina; C – Solução placebo após hidrólise alcalina; D – Diluente

Figura 37: Comparação entre os perfis cromatográficos da solução de apramicina e solução placebo submetidas à 2 horas de degradação térmica com os perfis cromatográficos da solução padrão trabalho 100% apramicina e do diluente. Condições Nominais. A – Solução padrão 100% apramicina; B- Solução de apramicina após degradação térmica; C – Solução placebo após degradação térmica; D – Diluente

Os cromatogramas do diluente e da fase móvel não apresentaram picos com eluição simultânea com o pico da apramicina.

Submetendo-se a solução padrão a 100°C por uma e por duas horas, verificou-se que diminuição da área do pico da apramicina de cerca de 2% e de 6%, respectivamente, em relação à área da solução padrão de trabalho 100%. Uma diminuição da área é um indício de degradação progressiva com o passar do tempo, já que na segunda hora o valor da área foi menor que na primeira. Embora haja métodos que empreguem o aquecimento da amostra no procedimento de derivatização, como já foi citado anteriormente (item 5.2.1.2), nenhum deles emprega condições tão drásticas e não é, portanto, aconselhável aquecer a amostra numa temperatura alta por um intervalo de tempo prolongado.

No caso da hidrólise alcalina, observou-se uma diminuição da área de cerca de 77% em relação ao pico referente à apramicina no cromatograma da solução padrão 100% na primeira hora e uma diminuição de cerca de 68% do mesmo pico na segunda hora. Os perfis cromatográficos da primeira e segunda hora de degradação foram bem semelhantes e em ambos foi observado o surgimento de um pico em torno de 5 minutos.

Já nos perfis cromatográficos tanto da primeira quanto da segunda hora das soluções de apramicina submetidas à hidrólise ácida e à oxidação o pico referente à apramicina não foi observado, uma possível evidência de sua total degradação. Em vista disso, decidiu-se preparar duas novas soluções-padrão de apramicina (Solução Hidrólise Ácida 2 e Solução Oxidação 2) e submeter novamente uma à hidrólise ácida e a outra à oxidação, porém, com a realização de 4 coletas de cada amostra durante o período de uma hora com o intervalo de quinze minutos entre cada uma. Posteriormente, cada uma delas foi derivatizada e injetada conforme itens 4.2.2.7 e 4.2.2.8. Os perfis cromatográficos obtidos em cada tempo de coleta foram idênticos aos de 1 e 2 horas em ambos os tipos de degradação.

Em se tratando da degradação forçada por oxidação, o fato de se ter adicionado peróxido de hidrogênio ao meio pode ter causado alterações não somente na apramicina, mas também nos demais componentes, inclusive no próprio OPA e/ou no ácido mercaptoacético, o que impediria a ocorrência da reação de derivatização e, conseqüentemente, o pico do derivado apramicina-OPA também não seria observado. Dessa forma, não se pode afirmar se houve ou não degradação total da apramicina ou se o que de fato ocorreu foi a alteração de condições do meio que impediram a

sua derivatização com OPA.

O raciocínio da possibilidade de condições inadequadas para a reação de derivatização da apramicina pode ser aplicado ao caso das hidrólises ácida e alcalina. De acordo com DORRESTEIJN et al.^[86], o pH do meio é um fator que influencia a reação de derivatização de OPA com aminas primárias em meio a um tiol pois, quanto menor o pH, mais o OPA tende a reagir com o tiol, o que causa uma redução na formação dos derivados isoindóis. Considerando-se que nas hidrólises ácida e alcalina o pH do meio reacional foi modificado, a diminuição da área do pico referente à apramicina (hidrólise alcalina), ou a sua ausência (hidrólise ácida), poderiam ser uma consequência não da degradação propriamente dita da apramicina, mas de uma reação de derivatização incompleta ou impedida pelas condições do meio.

Para esclarecer essa questão, duas novas soluções padrão de apramicina foram novamente preparadas e submetidas à hidrólise ácida (Solução Hidrólise Ácida 3) e alcalina (Solução Hidrólise Alcalina 2) por 2 horas, conforme descrito no item 4.2.2.4; antes da derivatização, contudo, o pH do meio foi ajustado em torno de 7,0 (6,96 – hidrólise ácida e 6,98 – hidrólise alcalina), para que houvesse a neutralização do ácido/base adicionados em cada caso, numa tentativa de minimizar a influência do pH do meio na reação. Paralelamente também foi preparada uma solução padrão de apramicina em água e antes de sua derivatização, foi medido o pH do meio, cujo valor foi 9,32. As três soluções em questão foram derivatizadas conforme itens 4.2.2.7 e a seguir injetadas nas condições nominais do método (conforme item 4.2.2.8). As Figuras 38 e 39 mostram uma comparação do perfil cromatográfico da solução padrão de trabalho 100% de apramicina não submetida à degradação com a solução padrão submetida à hidrólise ácida e alcalina, respectivamente após 2 horas de degradação. Logo após, a Tabela 14 traz as áreas obtidas em cada caso e a comparação com área média da solução padrão de apramicina não-degradada.

Figura 38: Comparação entre o perfil cromatográfico da solução de apramicina após 2 horas de hidrólise ácida e ajuste de pH com o perfil cromatográficos da solução padrão trabalho 100% apramicina. Condições Nominais. A – Solução padrão 100% apramicina; B- Solução de apramicina após hidrólise ácida

Figura 39: Comparação entre o perfil cromatográfico da solução de apramicina após 2 horas de hidrólise alcalina e ajuste de pH com o perfil cromatográficos da solução padrão trabalho 100% apramicina. Condições Nominais. A – Solução padrão 100% apramicina; B- Solução apramicina após hidrólise alcalina

Tabela 14. Teste de seletividade: Áreas obtidas para o pico referente à apramicina na hidrólise ácida e alcalina com ajuste de pH antes da reação de derivatização e comparação das mesmas com a área do mesmo pico para a solução padrão não-degradada

Tipo de Degradação	Área pico Apramicina (média 3 injeções)	% Área do pico da apramicina em relação à área do mesmo obtida para a solução padrão 100%*
Hidrólise Ácida – 2 horas	4.421.378,00	91,14
Hidrólise Alcalina – 2 horas	4.591.593,00	94,65

* Área Média das 3 injeções efetuadas para a solução padrão de apramicina foi de 4.851.007,33

Analisando-se os resultados da Tabela 14 e os perfis cromatográficos obtidos neste teste, percebe-se que houve um aumento significativo das áreas dos picos referentes à apramicina, tanto no caso da hidrólise ácida quanto no caso da hidrólise alcalina, em relação aos resultados anteriormente obtidos para essas mesmas condições de degradação forçada. Este teste ajudou a esclarecer que a aparente degradação observada no começo era, na realidade, falta de condições adequadas para a ocorrência da reação de derivatização, o que foi contornado com a neutralização do pH do meio após a hidrólise ácida/alcalina.

No entanto, quando se verifica que o pH da solução padrão de apramicina (não degradada) antes da reação é cerca de 9,3, percebe-se que o pH igual a 7,0, embora tenha proporcionado obtenção de melhores resultados, pode não ser ainda o pH ideal para a reação, o que ajude a explicar uma diminuição das áreas dos picos de apramicina nas soluções submetidas à hidrólise (ácida – cerca de 9%; alcalina – cerca de 5%) em relação à área do mesmo pico obtido na injeção da solução padrão de mesma concentração de apramicina (vide Tabela 14 acima). Essa diminuição, contudo, pode representar uma degradação de apramicina ou ainda do derivado apramicina-OPA, mas, como se tem uma reação de derivatização envolvida, não se pode confirmar essas hipóteses.

Em se tratando do placebo, em todas as condições de degradação forçada não se observou a formação de produtos de degradação cujo(s) pico(s) pudessem interferir com o pico da

apramicina, o que significa que os componentes da amostra, mesmo em caso de possível degradação, não interferem com a resposta da apramicina quando o método em questão é aplicado.

5.3.3 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da construção de 3 curvas padrão distintas com padrões de concentração entre 0,02 e 0,05 mg/mL, (na faixa de 60 a 130%) preparados e derivatizados conforme descrito nos itens 4.2.2.3 e 4.2.2.7. Cada solução padrão de trabalho foi injetada em triplicata nas condições descritas no item 4.2.2.8; os valores médios das áreas obtidas para o pico da apramicina para cada solução de cada uma das curvas construídas estão descritos na Tabela 15 e a curva padrão média obtida encontra-se na Figura 40.

Tabela 15. Concentrações das soluções padrão de trabalho empregadas em cada uma das 3 curvas de calibração construídas e as respectivas áreas médias obtidas para o pico referente à apramicina

Concentração (%)	Conc. Curva 1 (mg/mL)	Área Média Curva 1	Conc. Curva 2 (mg/mL)	Área Média Curva 2	Conc. Curva 3 (mg/mL)	Área Média Curva 3
60	0,020952	2.810.912,67	0,021476	2.964.962,67	0,020603	2.860.913,00
75	0,025492	3.480.098,33	0,026365	3.639.415,00	0,027063	3.811.184,33
90	0,031777	4.342.448,67	0,031777	4.407.601,50	0,031777	4.337.130,33
100	0,035444	4.841.891,00	0,035444	4.878.618,33	0,034745	4.808.226,50
115	0,039809	5.389.789,67	0,039809	5.485.321,67	0,039285	5.339.257,00
130	0,045571	6.082.704,00	0,045571	6.218.706,00	0,046094	6.197.519,00

Figura 40: Curva de calibração média Área pico apramicina *versus* Concentração de apramicina construída com base nas 3 curvas de calibração utilizadas na avaliação da linearidade do método

Conforme se verifica pelo gráfico acima, a equação da reta obtida é equivalente a $y = 132887304,980x + 127223,837$, calculada pelo método dos quadrados mínimos e o coeficiente de correlação (r) (igual à raiz quadrada do R^2 , que foi 0,998) é igual a 0,999, estando, portanto, dentro dos limites preconizados pelos compêndios oficiais. Estes valores significam que o método é linear dentro do intervalo estudado, de 0,02 a 0,05 mg/mL (60 a 130%) e produz uma resposta diretamente proporcional à concentração de apramicina contida na solução.

5.3.4 Precisão

Conforme já citado no item 2.4.2.4, o ensaio de precisão é feito com o intuito de se avaliar a proximidade de resultados entre ensaios independentes de uma mesma amostra. Isto pode ser feito em três níveis: repetibilidade (ou repetitividade, (de acordo com o INMETRO^[80]), ou ainda precisão intra-dia), precisão inter-dia e reprodutibilidade. Para o método em questão só foram avaliadas a repetibilidade e a precisão inter-dia, ambas conforme preconizado pela ANVISA.^[79]

Para o ensaio da repetibilidade do método foi avaliada efetuando-se 6 injeções consecutivas da solução padrão de trabalho de apramicina de concentração 100% preparada e derivatizada conforme itens 4.2.2.3 e 4.2.2.7 e injetada conforme condições cromatográficas descritas no item 4.2.2.8. Já a precisão inter-dia compreendeu a repetição deste mesmo ensaio por mais dois dias consecutivos, utilizando-se o mesmo equipamento, porém, com diferentes analistas executando o preparo da solução padrão. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 17.

Tabela 16: Valores das áreas dos picos referentes à apramicina nas injeções consecutivas realizadas em cada um dos 3 dias de teste utilizados na avaliação da repetibilidade e precisão precisão inter-dia

Injeção	Áreas - Dia 1	Áreas - Dia 2	Áreas - Dia 3
1	4.847.683	4.821.100	4.759.013
2	4.844.902	4.841.791	4.755.105
3	4.833.088	4.841.096	4.743.980
4	4.844.171	4.780.551	4.731.879
5	4.833.304	4.792.479	4.719.006
6	4.821.574	4.789.855	4.710.190
Média	4.837.453,67	4.811.145,33	4.736.528,83
DPR*(%)	0,21	0,56	0,41
Média Total das Áreas Obtidas:			4.795.042,61
DPR* Total entre as Áreas Obtidas(%):			1,09

*DPR – Desvio Padrão Relativo

A precisão intra-dia e inter-dia foi avaliada através da determinação do desvio padrão entre os valores das áreas para as injeções consecutivas da mesma solução padrão de apramicina. Conforme se verifica através da proximidade dos valores das áreas obtidos na precisão intra-dia e inter-dia, e dos baixos valores de desvio padrão relativo entre as áreas, que estão dentro do limite máximo estipulado pelos compêndios oficiais ($\leq 2,0\%$), pode-se dizer que o método é preciso.

Mesmo avaliando-se a precisão do método durante a sua validação, a USP XXXII^[46] cita a necessidade da verificação da precisão do sistema cromatográfico como parte dos testes de adequação. A mesma é realizada através do cálculo de desvio padrão relativo dos dados referentes ao pico do composto de interesse (área ou altura e o tempo de retenção) em uma série de cinco ou seis replicatas de injeção, caso o critério seja $DPR \leq 2\%$, ou $DPR \geq 2,0\%$ entre as injeções, respectivamente.

5.3.5 Exatidão

No planejamento deste trabalho, tencionava-se, inicialmente, avaliar a exatidão da nova metodologia desenvolvida através do método de adição de padrão. Entretanto, como se conseguiu as informações referentes ao excipiente da amostra, o bicarbonato de sódio, optou-se por trabalhar com o método de recuperação, adicionando-se quantidades conhecidas do analito de interesse, em três níveis de concentração dentro do intervalo linear do método, a uma solução constituída apenas pelo excipiente, conforme descrito no item 4.2.2.5. As soluções obtidas foram derivatizadas conforme item 4.2.2.7 e injetadas na condições cromatográficas descritas no item 4.2.2.8. As Tabelas 17 e 18 abaixo trazem os resultados obtidos.

Tabela 17. Concentração de apramicina adicionada e recuperada em cada nível estudado

Amostra	Massa de Apramicina (mg)					
	Solução 70%		Solução 100%		Solução 130%	
	Adicionado (mg/mL)	Recuperado (mg/mL)	Adicionado (mg/mL)	Recuperado (mg/mL)*	Adicionado (mg/mL)	Recuperado (mg/mL)*
1	0,140	0,138	0,201	0,201	0,262	0,261
2	0,142	0,140	0,198	0,198	0,262	0,259
3	0,142	0,141	0,202	0,203	0,260	0,256

Tabela 18. Porcentagem de apramicina recuperada em cada nível de concentração em estudo

Amostra	% Recuperação		
	Solução 70%	Solução 100%	Solução 130%
1	98,57	98,30	100,52
2	98,59	100,14	98,56
3	98,30	98,42	98,75
Média	98,49	98,95	99,28
DPR* (%)	0,16	1,04	1,09
Média Total de Recuperação:			98,91%
DPR (%) entre os 3 níveis de concentração:			0,83

*DPR: Desvio Padrão Relativo

Todos os resultados obtidos encontram-se dentro dos limites permitidos para a porcentagem de recuperação e para o desvio padrão relativo entre as determinações, conforme previsto em compêndios oficiais. Os valores obtidos variaram de 98,57% a 100,52%, com baixo desvio padrão relativo, o que indica que o método é capaz de determinar a quantidade correta do analito, no caso a apramicina, contida na amostra.

5.3.6 Limites de quantificação e de detecção

Tanto o limite de detecção quanto o de quantificação foram determinados pelo método da relação visual sinal-ruído, onde se compara o sinal (no caso, a área do pico referente à apramicina) produzido por uma solução de baixa concentração do analito de interesse com o ruído da linha de base. No caso do limite de detecção esta relação deve estar em torno de 3:1, enquanto que no caso do limite de quantificação deve estar em torno de 10:1.

Foram preparadas e derivatizadas (conforme itens 4.2.2.6 e 4.2.2.7) soluções de

concentração decrescentes de apramicina até um valor tal que a área produzida do pico referente à apramicina na qual a relação sinal-ruído para o pico da apramicina fosse aproximadamente 3:1, indicativa da menor concentração que pode ser facilmente detectada pelo método. O perfil cromatográfico obtido para esta solução encontra-se na Figura 41 e a concentração da mesma, limite de detecção do método, foi de 0,02 $\mu\text{g/mL}$.

A solução padrão de apramicina cuja concentração produziu um pico cuja relação visual sinal-ruído era cerca de 10:1, proporção mínima na qual o analito pode ser não somente detectado mas também medido com exatidão e precisão em níveis aceitáveis, constituiu a concentração limite de quantificação. De acordo com este critério, o limite de quantificação estimado foi de 0,08 $\mu\text{g/mL}$ e o cromatograma obtido pode visto na Figura 42.

Figura 41. Perfil cromatográfico da solução de apramicina de concentração 0,02 $\mu\text{g/mL}$ (derivatizada com OPA em meio a ácido mercaptoacético) utilizada na determinação do limite de detecção. Condições cromatográficas nominais

Figura 42. Perfil cromatográfico da solução de apramicina de concentração 0,08 $\mu\text{g/mL}$ (derivatizada com OPA em meio a ác. mercaptoacético) utilizada na determinação do limite de detecção. Condições cromatográficas nominais

Na Tabela 19, tem-se as áreas médias obtidas para cada determinação, bem como os respectivos desvios-padrão relativos. No caso do limite de quantificação, a proximidade entre as áreas e o baixo desvio padrão relativo é indicativo de que a concentração de 0,08 $\mu\text{g/mL}$ pode ser determinada com exatidão e precisão.

Tabela 19. Áreas médias obtidas para o pico referente à apramicina das soluções empregadas na determinação dos limites de detecção e de quantificação

Amostra	Áreas Obtidas	
	Limite de Detecção	Limite de Quantificação
1	1619	8569
2	1602	8670
3	1690	8646
Média	1637	8628
DPR* (%)	2,85	0,61

*DPR – Desvio Padrão Relativo

Com o término da determinação dos limites de quantificação e de detecção, foi também finalizada a validação do método, o qual demonstrou ser adequado para a finalidade pretendida, ou seja, o doseamento de apramicina em pó oral solúvel. A próxima etapa foi verificar a sua aplicabilidade, bem como correlacioná-lo com um método oficial já bem definido e caracterizado. Para tanto, procedeu-se à determinação de apramicina em 3 lotes de pó oral solúvel empregando-se o método físico-químico proposto e o método microbiológico turbidimétrico oficial.

5.4 Determinação do teor de apramicina pelo método físico-químico por CLAE

O método físico-químico recém-desenvolvido foi empregado para a análise de 3 lotes, sendo preparadas 3 amostras para cada um deles. Como a análise foi feita em dia diferente da determinação da linearidade, julgou-se importante e necessário construir uma nova curva de calibração. Para tal, foram preparadas 3 soluções-padrão de trabalho de apramicina, com concentrações de 80, 100 e 120% em relação à concentração teórica da amostra. Tanto as amostras quanto as soluções padrão de trabalho de apramicina foram preparadas e derivatizadas conforme descrito nos itens 4.2.3 e 4.2.2.7, respectivamente, sendo as injeções realizadas em

triplicata para cada um e conforme as condições descritas no item 4.2.2.8..

A Figura 43 e a Tabela 20 trazem, respectivamente, a curva de calibração área *versus* concentração de apramicina e os resultados do teor da mesma obtidos na análise dos três lotes de pó oral solúvel.

Figura 43. Representação gráfica da curva de calibração Área *versus* Concentração de apramicina e equação da reta obtida pelo método físico-químico de doseamento de apramicina por CLAE

Tabela 20. Resultados do teor de apramicina obtidos para cada um dos três lotes de pó oral solúvel analisados pelo método recém-desenvolvido por CLAE

Amostra	% Apramicina (na forma de sulfato)		
	Lote A	Lote B	Lote C
1	95,33	98,73	102,59
2	95,64	97,95	101,72
3	96,10	98,45	103,72
Média	95,69	98,38	102,68
DPR* (%)	0,40	0,40	0,98

*DPR – Desvio Padrão Relativo

O coeficiente de correlação linear obtido através da análise de regressão para a curva de calibração construída foi maior do que 0,99, valor mínimo aceitável que representa a proporcionalidade entre a resposta medida e a concentração do analito, conforme já visto anteriormente. Este valor indica que o método foi empregado em condições adequadas de análise e que os resultados gerados são confiáveis. Dessa forma, o teor de apramicina para cada amostra foi calculado através da equação da reta obtida para a curva de calibração, e também considerando-se as diluições efetuadas.

De acordo com a Farmacopéia Britânica 2008^[8], o teor de apramicina para a apresentação pó oral solúvel deve estar entre 95 e 105%. Como pôde se visto na Tabela acima, todos os lotes testados encontram-se dentro dos limites estabelecidos. Faltava se os resultados obtidos para cada lote também estariam em concordância com a potência do antibiótico, que foi determinada posteriormente através do método microbiológico turbidimétrico conforme recomendações descritas no Apêndice XIV A, método B da Farmacopéia Britânica 2008^[28].

5.5 Método microbiológico: teste preliminar

O teste preliminar foi realizado com a finalidade de se avaliar a melhor condição para a determinação da potência de apramicina em termos das concentrações do inóculo e do antibiótico, parâmetros fundamentais, que influenciam diretamente a resposta do organismo-teste, o seu crescimento, que deve ser gradual na proporção da concentração da dose. Como esta resposta também é proporcional ao surgimento de turbidez nos vários tubos das séries, pode ser medida através de um fotômetro adequado e expressa em termos de transmitância; quanto maior o crescimento microbiano, maior a turbidez e menor a transmitância e vice-versa.

Os resultados obtidos no teste preliminar estão expressos nas Tabelas 21 e 22 que apresentam, respectivamente, as leituras de transmitância de cada uma das oito soluções padrão de trabalho de apramicina obtidas após incubação nas três diferentes concentrações de meio inoculado e as leituras obtidas para os controles-positivos de cada meio.

Tabela 21. Leituras de transmitância obtidas no ensaio preliminar de doseamento microbiológico de apramicina por turbidimetria

Concentração do Padrão de Apramicina (µg/mL)	Réplica	Transmitância Obtida (%)		
		Inóculo de 0,1%	Inóculo de 0,5%	Inóculo de 1,0%
128	1	100	100	51
	2	100	100	48
64	1	100	63	28
	2	100	70	29
32	1	100	30	25
	2	91	33	26
16	1	56	26	25
	2	56	26	28
8	1	40	26	25
	2	40	26	26
4	1	37	23	26
	2	34	27	25
2	1	35	24	25
	2	36	22	25
1	1	35	24	24
	2	34	22	21

Tabela 22. Leituras de transmitância obtidas para os controles-positivos de cada meio utilizado no ensaio preliminar de doseamento microbiológico de apramicina por turbidimetria

Réplica	Transmitância Obtida (%)		
	Inóculo de 0,1%	Inóculo de 0,5%	Inóculo de 1,0%
1	35	26	27
2	35	25	25

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 21, observa-se que quanto maior a concentração do inóculo, menos seletivo foi o meio quanto às diferentes concentrações de antibiótico empregadas. Os valores de transmitância obtidos para cada solução padrão de trabalho com os inóculos de 0,5% e 1,0% foram, em sua maioria, próximos entre si e próximos também dos valores de transmitância para os respectivos controles positivos (cerca de 25%) nos quais não houve adição de antibiótico, indicativo de que as concentrações das soluções-padrão de trabalho de apramicina estão muito baixas para esses meios, de modo que não se consegue observar inibição do crescimento microbiano.

Já o meio com inóculo de concentração 0,1% demonstrou ser o mais adequado dentre os três pois observa-se leituras de transmitância distintas entre os níveis de concentração estudados, evidência de crescimento microbiano gradual e proporcional à concentração de apramicina. Entretanto, as soluções-padrão de concentração 128 e 64 $\mu\text{g/mL}$ não são adequadas para se trabalhar nesta concentração de inóculo pois as leituras de transmitância para elas foram 100%, o que indica ausência de crescimento microbiano nas condições de incubação devido à elevada concentração do antibiótico. Também os padrões de concentrações 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$ não são adequados pois apresentaram valores de transmitância baixos, muito semelhantes àqueles obtidos para os controles positivos deste meio, ou seja, a concentração de antibiótico está muito baixa. As demais concentrações apresentaram valores de transmitância diferenciados e proporcionais à concentração do antibiótico, abrangendo uma faixa tal que é possível observar desde a ausência do crescimento microbiano (solução de 32 $\mu\text{g/mL}$, com transmitância próxima a 100%), crescimento intermediário (soluções-padrão de concentração 16 e 8 $\mu\text{g/mL}$ com valores de transmitância de 56% e 40%, respectivamente) e até crescimento próximo ao observado no controle positivo (solução de 4 $\mu\text{g/mL}$), o que leva a concluir que concentrações situadas entre 4 $\mu\text{g/mL}$ e 32 $\mu\text{g/mL}$ proporcionam maior seletividade e, conseqüentemente, melhor performance para o ensaio.

Em vista dos resultados obtidos no teste preliminar, concluiu-se que a condição mais adequada para o doseamento microbiológico de apramicina pelo ensaio turbidimétrico seria o emprego de meio de cultura cuja concentração final inóculo fosse de 0,1% e trabalhar com soluções-padrão com concentração na faixa de 32 $\mu\text{g/mL}$ e 4 $\mu\text{g/mL}$.

É importante notar que o meio de cultura empregado foi diferente em relação ao meio que é recomendado na Farmacopéia Britânica (BP) ^[28] para o doseamento da apramicina; o meio

recomendado é o meio H, enquanto o utilizado foi o meio C. O meio H é constituído de dextrose, triptona e extrato de carne, enquanto que o meio C contém, além dos reagentes já citados, extrato de levedura, cloreto de sódio e fosfato de potássio monobásico e bibásico. Com exceção desses dois últimos reagentes, que são destinados à tamponação do meio, os demais são nutrientes que tornam o meio mais rico e, portanto, asseguram um ambiente mais favorável ao crescimento microbiano, o que também contribui para obtenção de respostas mais definidas e distintas considerando-se diferentes concentrações do antibiótico. Isto é de grande importância quando se pretende aplicar o método de interpolação em curva padrão para o cálculo da amostra, pois proporciona obtenção de uma curva padrão mais linear.

Para a determinação do teor de apramicina pelo método turbidimétrico, decidiu-se, portanto, utilizar o meio antibiótico C da Farmacopéia Britânica, concentração de inóculo (*Salmonella choleraesuis*) de 0,1% e preparar soluções-padrão de trabalho em torno da faixa de 4 a 32 µg/mL.

5.6. Método Microbiológico: Determinação do teor de apramicina pelo método turbidimétrico

O ensaio dos três lotes de amostras de apramicina pó oral solúvel envolveu o preparo de 3 amostras para cada lote sendo que cada uma foi ensaiada em triplicata; foram também preparadas cinco soluções-padrão de trabalho de apramicina cujas concentrações variaram de 4,4 a 22,5 µg/mL, utilizadas para construção da curva de calibração, conforme descrito no item 4.2.4.1. Logo após, procedeu-se ao teste turbidimétrico realizado conforme descrito no item 4.2.4.4, baseado nos resultados obtidos do teste preliminar.

A Figura 44 e a Tabela 23 trazem, respectivamente, a curva de calibração de apramicina e os resultados de teor obtidos para as amostra testadas de cada lote.

Figura 44. Representação gráfica da curva de calibração % Transmitância *versus* Log concentração de apramicina e equação da reta obtida pelo método microbiológico turbidimétrico de determinação de apramicina

Tabela 23: Resultados do teor de apramicina obtidos para cada um dos três lotes de pó oral solúvel analisados pelo ensaio microbiológico turbidimétrico

Amostra	% Apramicina (na forma de sulfato)		
	Lote A	Lote B	Lote C
1	98,53	98,76	100,38
2	96,03	100,43	101,23
3	98,76	98,36	98,64
Média	97,77	99,18	100,08
DPR* (%)	1,55	1,11	1,32

*DPR – Desvio Padrão Relativo

A determinação da potência da apramicina foi feita através da interpolação do resultado da leitura de transmitância de cada amostra após 4 horas de incubação na curva de calibração

relacionando a % transmitância com o logaritmo das concentrações das 5 soluções-padrão empregadas. Percebe-se, portanto, que foi utilizado o delineamento 5 x 1, no qual se trabalham com 5 níveis de concentrações do padrão e um nível apenas da amostra. Embora a Farmacopéia Britânica recomende o delineamento 3 x 3, foi adotado o 5 x 1 pois foi possível realizar a análise dos 3 lotes em triplicata com um único ensaio e principalmente porque utiliza maior número de níveis de concentração, o que contribui para uma melhor estimativa da inclinação da reta e, conseqüentemente, proporciona maior exatidão nos resultados.

5.7 Comparação estatística entre os métodos turbidimétrico e por CLAE

A etapa final deste trabalho consistiu na comparação entre os resultados de análise de apramicina obtidos pelo método físico-químico inovador por CLAE com os resultados obtidos pelo ensaio turbidimétrico oficial.

Em se tratando de antibióticos, como é o caso da apramicina, há uma tendência em se comparar resultados obtidos por um método físico-químico com aqueles obtidos por um método microbiológico; essa comparação deve ser feita com cautela, uma vez que cada método mede um parâmetro distinto. Enquanto o método físico-químico mede a quantidade, o método microbiológico mede a potência de um determinado antibiótico baseada na sua resposta inibitória de crescimento de um microrganismo sensível. Os dois métodos podem apresentar resultados distintos devido aos graus de interferência peculiares a cada um deles e/ou também devido à natureza do antibiótico ou ainda da especialidade farmacêutica em questão, a qual pode conter substâncias interferentes, possíveis causas de desvios.

O fármaco apramicina é constituído de molécula única, diferentemente de outros antibióticos, como, por exemplo, a gentamicina e a neomicina, em que distintas formas moleculares apresentam diversa atividade terapêutica. Adicionalmente, a amostra em questão, pó oral solúvel, é uma formulação simples, incorporando o antibiótico e um único excipiente, o bicarbonato de sódio. Este, de acordo com estudos anteriores, não apresentou interferência com a resposta da apramicina no método físico-químico, o que também leva a pressupor isenção de interferência no método microbiológico. Desta forma, a expectativa é de que a potência obtida

pelo método microbiológico seja devida somente à quantidade de apramicina contida na amostra, devendo-se obter resultados próximos entre si seja pelo método físico-químico ou microbiológico, evidenciando correlação entre eles.

Para confirmar esta hipótese, optou-se por comparar ambos os métodos estatisticamente os resultados obtidos para cada um dos três lotes, empregando ambos os métodos. Adotou-se para tanto o Teste-t, com a premissa de que os dois grupos de amostras empregados apresentassem médias equivalentes. Decidiu-se efetuar a comparação a cada lote, de forma que as diferenças entre os mesmos não afetasse o resultado final do teste, muito ao contrário, conferisse maior segurança à conclusão.

As Tabelas 24, 25 e 26 trazem os resultados da análise estatística para os lotes A, B e C, respectivamente.

Tabela 24: Comparação estatística entre os resultados da determinação do teor de apramicina pelo método físico-químico por CLAE e o método microbiológico turbidimétrico para o lote A

	CLAE	Microbiológico
Média	95,69	97,77
Variância	0,15	2,29
Observações	3	3
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t (t calculado)	-2,420	
P(T<=t) bi-caudal	0,137	
t crítico bi-caudal	4,303	

Tabela 25: Comparação estatística entre os resultados da determinação do teor de apramicina pelo método físico-químico por CLAE e o método microbiológico turbidimétrico para o lote B

	CLAE	Microbiológico
Média	98,71	98,52
Variância	0,56	0,71
Observações	3	3
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t (t calculado)	-0,963	
P(T<=t) bi-caudal	0,437	
t crítico bi-caudal	4,303	

Tabela 26: Comparação estatística entre os resultados da determinação do teor de apramicina pelo método físico-químico por CLAE e o método microbiológico turbidimétrico para o lote C

	CLAE	Microbiológico
Média	102,68	100,42
Variância	1,01	0,63
Observações	3	3
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t (t calculado)	2,180	
P(T<=t) bi-caudal	0,161	
t crítico bi-caudal	4,303	

Em todos os casos percebe-se que o $t_{calculado}$ (em valor absoluto) foi menor que o $t_{crítico}$ e, portanto, aceita-se a hipótese de que as médias das análises de cada lote por CLAE e pelo método microbiológico são iguais no nível de significância de 0,05 ($\alpha = 0,05$). De acordo com a aplicação do Teste t, o qual presume médias equivalentes, pode-se afirmar que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelo método físico-químico por CLAE e o

método microbiológico oficial, por turbidimetria. Em outras palavras, mediante os resultados obtidos, pode-se afirmar que existe boa correlação entre ambos os métodos, indicativo de que os dois podem ser usados indistintamente para a análise de apramicina em amostras de pó oral solúvel.

Embora o ensaio turbidimétrico descrito pela Farmacopéia Britânica^[28] seja o método oficial para a determinação da potência de apramicina, e, dentre os métodos microbiológicos apresente boa precisão e a vantagem de necessitar de um menor período de incubação, apresenta limitações que podem afetar o resultado final, tais como: não se aplica a amostras turvas ou coloridas; a amostra a ser analisada deve estar em solução; é muito susceptível a variações no tempo e na temperatura de incubação (todos os tubos devem chegar rapidamente à uma mesma temperatura de incubação e a interrupção do crescimento também deve ser feita do modo simultâneo), o que dificulta a reprodutibilidade do método; em função da complexidade ou da diversidade de componentes da amostra pode haver interferências na leitura de transmitância.

Por outro lado, o emprego de métodos físico-químicos na análise de antibióticos vem se tornando crescente, sobretudo com a aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência que, além da maior rapidez na execução da análise e na obtenção do resultado, apresenta atributos indispensáveis como sensibilidade, especificidade, exatidão e precisão, que tornam o seu emprego vantajoso em relação a outros métodos. Dessa forma, o método proposto para determinação do teor de apramicina em pó oral solúvel por CLAE se constitui numa alternativa bastante interessante, viável e mesmo vantajosa em relação ao ensaio turbidimétrico, podendo ser aplicado com sucesso, conforme já demonstrado pelos resultados obtidos neste trabalho.

Pode-se considerar o método microbiológico válido e necessário exclusivamente para situações em que sejam caracterizadas suspeitas de falsificação, com impedimento da rastreabilidade da qualidade do fornecedor do insumo ou fabricante da especialidade farmacêutica, assim como quando da inexistência de recursos financeiros para a aquisição de instrumentação analítica necessária para o método cromatográfico.

Em todas as demais circunstâncias deve-se considerar factível e desejável que o doseamento de apramicina seja por CLAE que irá retratar a atividade biológica do produto, sem prejuízos, portanto, para a saúde pública.

6 CONCLUSÕES

- É factível a aplicação de método empregando CLAE com derivatização pré-coluna com OPA e detecção por UV, sendo o mesmo adequado à finalidade pretendida, conforme foi demonstrado pelos resultados obtidos para os parâmetros de validação estudados de acordo com os compêndios oficiais: robustez, especificidade, linearidade (intervalo de 0,02 a 0,05 mg/mL), precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção;
- A determinação do teor de apramicina em pó oral solúvel por CLAE com detecção por UV mostrou-se adequada e interessante em termos de obtenção de resultados confiáveis, com custo acessível e em tempo real;
- Os teores de apramicina obtidos para os 3 lotes de pó oral solúvel tanto pelo método inovador quanto pelo método microbiológico turbidimétrico estão dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopéia Britânica na monografia referente à forma farmacêutica estudada;
- A avaliação comparativa do método físico-químico inovador proposto neste trabalho com o método microbiológico oficial pelo teste T presumindo médias equivalentes demonstrou não haver diferença significativa entre os mesmos para $\alpha = 0,05$;
- Pode-se vislumbrar futura aplicação do método estudado na análise de outras formas de apresentação de apramicina ou ainda no controle sanitário de derivados agropecuários de consumo humano. Embora este aspecto não se constitua objeto do presente trabalho, é de fundamental importância no âmbito da saúde.

7 REFERÊNCIAS ¹

1. STEAD, D.A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, v.747, n.1/2, p.69-93, 2000.
2. EMEA. Committee for Veterinary Medicinal Products. Apramicina. Disponível em: <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/052698en.pdf>. Acesso em: 15 out. 2008.
3. PERZYNSKI, S.; CANNON, M.; CUNDLIFE, E.; CHAHWALA, S.B.; DAVIES, J. Effects of Apramycin, a novel aminoglycoside antibiotic. *European Journal of Biochemistry*, v.99, p.623, 1979.
4. BRADY, M.S.; KATZ, S.E. Incidence of residues in food animal origin. In: AGARWAL, K.V., ed. *Analysis of antibiotic/drug residues in food products of animal origin*. New York: Plenum Press; London: Kluwer Academic, 1992. p.5-19. (Proceedings of an American Chemical Society Agricultural and Food Chemistry Division Symposium on Antibiotic/Drug Residues in Food Products of Animal Origin, held August 26-30, 1991, in New York, New York).
5. LACAZ, C.S., coord. *Antibióticos*. 3.ed. São Paulo: Edgard Blucher, Universidade de São Paulo, 1975. p.419.
6. MACNEIL, J.D.; ELLIS, R. Regulatory overview of antibiotic use in food-producing animals in North America and current methods of detection and analysis. In: OKA, H.; NAKAZAWA, H.; HARADA, K.; MACNEIL, J.D., eds. *Chemical analysis for antibiotics used in agriculture*. Arlington: AOAC International, 1995. cap.1, p.1-29.
7. ISOHERRANEN, N.; SOBACK, S. Chromatographic methods for analysis of aminoglycoside antibiotics. *Journal of AOAC International*, v.82, n.5, p.1017-1045, 1999.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

8. BRITISH pharmacopoeia (Veterinary): 2009. London: Her Majesty's Stationery Office, 2008. p.38-40, p.122-125.
9. PINTO, T.J.; KANEKO T.M.; OHARA, M.T. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p.261-287.
10. HEWITT, W. *Microbiological assay: an introduction to quantitative principles and evaluation*. New York, London: Academic Press, 1977. p.17-68, 136-150, 214-242.
11. KIM, B.; LEE, S.; LEE, H.; OK, J. Reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using pre-column derivatization with phenylisocyanate. *Biomedical Chromatography*, v.17, p.396-403, 2003.
12. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de análise instrumental*. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p.641-642.
13. YAMAMOTO, C.H. *Dosagem microbiológica de neomicina por difusão em agar: redução do tempo de análise pela aplicação do cloreto de trifeniltetrazólio*. São Paulo, 1994. 169p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
14. FONG, G.W.; LAM, S.K., eds. *HPLC in the pharmaceutical industry*. New York: Marcel Dekker, 1991. p.iii. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.47).
15. BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L., eds. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. p.1039-1042.
16. VEYSSIER, P.; BRYSKIER, A. Aminocyclitol aminoglycosides. In: BRYSKIER, A., ed. *Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals*. Washington: ASM Press, 1999. cap.16, p.453-457.

17. SALISBURY, C.D.C. Chemical analysis of aminoglycoside antibiotics. In: OKA, H.; NAKAZAWA, H.; HARADA, K.; MACNEIL, J.D., eds. *Chemical analysis for antibiotics used in agriculture*. Arlington: AOAC International, 1995. cap.9, p.307-331.

18. SILVA, J.G.; HYPPOLITO, M.A.; OLIVEIRA, J.A.A.; CORRADO, A.P.; ITO, I.Y.; CARVALHO, I. Aminoglycoside antibiotic derivatives: preparation and evaluation of toxicity on cochlea and vestibular tissues and antimicrobial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.15, p.3625, 2007.

19. O'CONNOR, S.; LAM, L.K.T.; JONES, N.D.; CHANEY, M.O. Apramycin, a unique aminocyclitol antibiotic. *Journal of Organic Chemistry*, v.41, n.12, p.2087-2092, 1976.

20. WALTON, J.R. Apramycin, a new aminocyclitol antibiotic. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.4, p.309-313, 1978.

21. TATSUTA, K.; AKIMOTO, K.; TAKAHASHI, H.; HAMATSU, T.; ANNAKA, M.; KINOSHITA, M. Total synthesis of aminoglycoside antibiotics, apramycin and saccharocin (KA-5685). *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v.57, n.2, p.529-538, 1984.

22. HERMANN, T.; TERESHKO, V.; SKRIPKIN, E.; PATEL, D.J. Apramycin recognition by human ribosomal decoding site. *Blood Cells, Molecules, & Diseases*, v.38, p.193-198, 2007.

23. MARTINDALE: the complete drug reference. 35.ed. London: Pharmaceutical Press, 2007. p.182.

24. Apralan (Apramycin Sulfate) Soluble Powder. Disponível em: <http://www.fda.gov/cvm/FOI/106-964EA.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2008.

25. Apralan pó oral solúvel. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/SERVICOS/CPVS/PAGINA_D E_TESTE/APRALANP%D3SOL%D AVEL.HTM. Acesso em: 04 nov. 2008.

26. Apralan pó oral solúvel. Disponível em: <http://www.elanco.com.br/Produtos/Su%C3%ADnos/Apralan/tabid/230/Default.aspx>. Acesso em: 04 nov. 2008.
27. ZHANG, L.; WANG, Z.; CHANG, B.; YANG, W. Determination of Apramycin in animal feeds by solid-phase extraction and liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, v.90, n.4, p.885-891, 2007.
28. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 2008. v.4, p.A95; A323-A329.
29. YAMAMOTO, C.H. *Aspectos da qualidade da tetraciclina em preparações farmacêuticas sólidas: correlação entre os métodos de dosagem por cromatografia líquida de alta eficiência e turbidimétrico*. São Paulo, 1999. 277p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
30. KAVANAGH, F. Elements of photometric assaying. In: _____. *Analytical microbiology*. New York: Academic Press, 1963. cap.4, p.142-217.
31. FOSTER, J.W. Quantitative estimation of penicillin. *Journal of Biological Chemistry*, v.144, p.285-286, 1942.
32. McMAHAN, J.R. An improved short time turbidimetric assay penicillin. *Journal of Biological Chemistry*, v.153, p.249-258, 1944.
33. RAKE, G.; JONES, H. A rapid method for estimation of penicillin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.54, p.189-190, 1943.
34. LEE, S.W.; FOLEY, E.J.; WALLACE Jr., J.H. Improvement in the turbidimetric assay for penicillin. *Journal of Biological Chemistry*, v.152, p.485-486, 1944.

35. BOND, C.R.; DAVIES, D.L. The microbiological assay of penicillin by the turbidimetric method, using *Staphylococcus aureus*. *Analyst*, v.73, p.251-254, 1948.
36. JOSLYN, D.A.; GALBRAITH, M. A turbidimetric method for the assay of antibiotics. *Journal of Bacteriology*, v.59, p.711-716, 1950.
37. GAVIN, J.J. Analytical microbiology. III. Turbidimetric methods. *Applied Microbiology*, v.5, p.235-243, 1957.
38. LOY, H.W.; WRIGHT, W.W. Microbiological assay of amino acids, vitamins and antibiotics: application of tube methods. *Analytical Chemistry*, v.31, n.6, p.971-974, 1959.
39. RIPPERE, R.A. Some principles of microbiological turbidimetric assays of antibiotics. *Journal – Association of Official Analytical Chemistry*, v.62, n.4, p.951-956, 1979.
40. JOSHI, S. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.28, p.795-809, 2002.
41. CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. *Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação*. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77p. (Série apontamentos).
42. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S., orgs. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: UNICAMP, 2006. p.273-387.
43. Análise Instrumental – Cromatografia Líquida de Alta Resolução - CEFET-Química Unidade Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.cefeteq.br/aluno/arquivos/apostilas/instrumental/CLAE.pdf>. Acesso em: 20 out. 2008.

44. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Disponível em: http://www.farmacopeia.org.br/docs_consultas/cons_1_cromatografia_liquida_de_alta_eficiencia.pdf. Acesso em: 20 fev. 2009.
45. CIOLA, R. *Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC*. São Paulo: Edgard Blücher, 2003. p.8-14, 75-77, 127.
46. UNITED States pharmacopoeia. 32.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009. v.1, p.233-237, p.734-736.
47. SOLTÉS, L. Aminoglycoside antibiotics: two decades of their HPLC bionalysis. *Biomedical Chromatography*, v.13, n.1, p.3-10, 1999.
48. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. *Practical HPLC method development*. 2.ed. New York: John Wiley, 1997. p.1-21, p.686-708.
49. ANHALT, J.P.; BROWN, S.D. High-performance liquid-chromatographic assay of aminoglycoside antibiotics in serum. *Clinical Chemistry*, v.24, n.11, p.1940-1947, 1978.
50. FABRE, H.; SEKKAT, M.; BLANCHIN, M.D.; MANDROU, B. Determination of Aminoglycosides in pharmaceutical formulations. II. High performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, v.7, n.12, p.1711-1718, 1989.
51. SHAIKH, B.; JACKSON, J.; GREG, G. Determination of neomycin in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v.571, p.189-198, 1991.
52. WICHERT, B.; SCHREIER, H.; DERENDORF, H. Sensitive liquid chromatography assay for the determination of amikacin in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.9, n.3, p.251-254, 1991.

53. OLSON, L.; PICK, J.; ELLIS, W.Y.; LIM, P. A chemical assessment and HPLC assay validation of bulk paromomycin sulfate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.15, p.783-793, 1997.
54. ZHOU, Y.X.; YANG, W.J.; ZHANG, L.Y.; WANG, Z.Y. Determination of kanamycin A in animal feeds by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v.30, p.1603-1615, 2007.
55. SOUZA, J.; OGILVIE, R.I. Determination of gentamicin components C18, C2 e C1 in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v.232, p.212-218, 1982.
56. WEIGAND, R.; COOMBES, R.J. Gentamicin determination by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v.281, p.381-385, 1983.
57. CHISSEL, J.F., FREEMAN, M., LORAN, J.S., SEWELL, G.J., STEAD, J.A. British Pharmacopeial gentamicin sulphate component ratio test by high performance liquid chromatography – The effect of derivative breakdown on final result. *Journal of Chromatography*, v. 369, 1986, p. 213-217.
58. ALBRACHT, J.H. Analysis of gentamicin in raw material and pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v.389, p.306-311, 1987.
59. CLAES, P.J.; BUSSON, R.; VANDERHAEGHE, H. Determination of the component ratio of commercial gentamicins by high performance liquid chromatography using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography*, v.298, p.445-457, 1984.
60. ESSERS, L. An automated high performance liquid chromatographic method for the determination of aminoglycosides in serum using pre-column sample clean-up and derivatization. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*, v.305, n.2, p.345-352, 1984.

61. LAI, F.; SHEEHAN, T. Enhancement of detection sensitivity and cleanup selectivity for tobramycin through pre-column derivatization. *Journal of Chromatography*, v.609, p.173-179, 1992.
62. CATURLA, M.C.; CUSIDO, E. High-performance liquid chromatography method for the determination of aminoglycosides based on automated pre-column derivatization with o-phthalaldehyde. *Journal of Chromatography*, v.593, p.69-72, 1992.
63. KABRA, P.; BHATNAGER, P.; NELSON, M. Liquid chromatographic determination of amikacin in serum with spectrophotometric detection. *Journal of Chromatography*, v.307, p.224-229, 1984.
64. GAMBARDELLA, P.; PUNZIANO, R.; GIONTI, M.; GUADALUPI, C.; MANCINI, G.; MANGIA, A. Quantitative determination and separation of analogues of aminoglycoside antibiotics by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v.348, p.229-240, 1985.
65. BARENDT, D.; ZWAAN, C.; HULSHOFF, A. Microdetermination of tobramycin in serum by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography*, v.225, p.417-426, 1981.
66. ISOHERRANEN, N.; SOBACH, S. Determination of Gentamicins C1, C1a and C2 in plasma and urine by HPLC. *Clinical Chemistry*, v.46, n.6, pt.1, p.837-842, 2000.
67. POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J.; NIEDZIELSKA, J. Sample preparation for residue determination of gentamicin and neomycin by liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A*, v.914, p.59-66, 2001.
68. LIU, Z.; SHA, Y.; HUANG, T.; YANG, B.; DUAN, G.-L. High-performance liquid chromatographic determination of vertilmicin in rat plasma using sensitive fluorometric derivatization. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.828, n.1/2, p.2-8, 2005.

69. STATLER, J.A. Determination of tobramycin using high performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*, v.527, n.1, p.244-246, 1990.
70. CLAROT, I.; CHAIMBAULT, P.; HASDENTEUFEL, F.; NETTER, P.; NICOLAS, A. Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography, A*, v.1031, p.281-287, 2004.
71. MEGOULAS, N.C.; KOUPPARIS, M.A. Development and validation of a novel HPLC/ELSD method for the direct determination of tobramycin in pharmaceuticals, plasma and urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.382, p.290-296, 2005.
72. SERRANO, J.M.; SILVA, M. Rapid and sensitive determination of aminoglycoside antibiotics in water samples using a strong cation-exchange chromatography non-derivatisation method with chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography, A*, v.1117, p.176-183, 2006.
73. LOVERING, A.M.; WHITE, L.O.; REEVES, D.S. Identification of aminoglycoside - acetylating enzymes by high pressure liquid chromatographic determination of their reaction products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p.10-12, 1984.
74. POLTA, J.A.; JOHNSON, D.C.; MERKEL, K.E. Liquid chromatographic separation of aminoglycosides with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography*, v.324, p.407-414, 1985.
75. SWEENEY, D.J.; COLEMAN, M.R. Determination of apramycin in swine kidney tissue by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, v.81, n.6, p.1141-1145, 1998.
76. BOGIALLI, S.; CURINI, R.; CORCIA, A.; LAGANÁ, A.; MELE, M.; NAZZARI, M. Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A*, v.1067, p.93-100, 2005.

77. ZHU, W.; YANG, J.; WEI, W.; LIU, Y.; ZHUANG, S. Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography – eletrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps. *Journal of Chromatography, A*, v.1207, p.29-37, 2008.
78. BONCHEV, P.R.; PAPAZOVA, P.; KONFINO, M.; DIMOVA, D. Spectrophometric method for determination of tobramycin, apramycin and kanamycin in formulations. *Mikrochimica Acta*, v.3, n.5/6, p.459-465, 1984.
79. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anexo da Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, publicada no D.O.U. de 02 de junho de 2003.
80. INMETRO – Instituto Nacional de metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - DOQ-CGCRE-008 – Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão: 01-Março de 2003.
81. ICH - International Conference on Harmonization (2006) *ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q2 (R)*. Geneva, Switzerland.
82. RIBANI, M.; GRESPAN BOTTOLI, C.B.; COLLINS, C.H.; FONTES JARDIM, I.C.S.; COSTA MELO, L.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
83. SHABIR, G. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography, A*, v.987, p.57-66, 2003.
84. SWARTZ, M.E.; KRULL, I.E. Validação de métodos cromatográficos. *Pharmaceutical Technology: Edição Brasileira*, v.2, n.3, p.12-20, 1998.

85. UNITED States pharmacopoeia. 32.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008. v.2, p.2489.
86. DORRESTEIJN, R.C.; BERWALD, L.G.; ZOMER, G.; GOOIJER, C.D.; WIETEN, G. Determination of amino acids using o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatization: effect of reaction conditions. *Journal of Chromatography, A*, v.724, 1996, p.159-167.
87. KAALE, E.; GOVAERTS, C.; HOOGMARTENS, J.; SCHEPDAEL, A. Mass spectrometric study to characteriza thioisondole derivatives of aminoglycoside antibiotics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.19, p.2918-2922, 2005.
88. JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. Part III. Ruggedness, re-validation and system suitability. *Instrumentation Science & Technology*, v.26, n.1, p.19-35, 1998.
89. TAWA, R.; MATSUNAGA, H.; FUJIMOTO, T. High-performance liquid chromatographic analysis of aminoglycoside antibiotics. *Journal of Chromatography, A*, v.812, p.141-150, 1998.
90. JACOBS, W.A.; LEBURG, W.; MADAJ, E.J. Stability of o-phthalaldehyde-derived isoindoles. *Analytical Biochemistry*, v.156, p.334-340, 1986.
91. STOBAUGH, J.F.; REPTA, A.J.; STERNSON, L.A.; GARREN, K.W. Factors affecting the stability of fluorescent isoindoles derived from reaction of o-phthalaldehyde and hydroxyalkylthiols with primary amines. *Analytical Biochemistry*, v.135, p.495-504, 1983.
92. KAALE, E.; LEONARD, S.; VAN SCHEPDAEL, A.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Capillary eletrophoresis analysis of gentamicin sulphate with UV detection after pre-capillary derivatization with 1,2-phthalic dicarboxaldehyde and mercaptoacetic acid. *Journal of Chromatography, A*, v.895, p.67-79, 2000.

93. KAALE, E.; LEONARD, S.; VAN SCHEPDAEL, A.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Development and validation of a simple capillary zone electrophoresis method for the analysis of kanamycin sulphate with UV detection after pre-capillary derivatization. *Journal of Chromatography A*, v.924, p.451-458, 2001.

94. KAALE, E.; LONG, Y.; HUMPHREY, F.; GOVAERTS, C.; DESMET, K.; VAN SCHEPDAEL, A.; HOOGMARTENS, J. Gentamicin assay in human serum by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, v.26, 640-647, 2005.

95. KAALE, E.; VAN SCHEPDAEL, A.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Development and validation of capillary electrophoresis method for tobramycin with precapillary derivatization and UV detection. *Electrophoresis*, v.23, p.1695-1701, 2002.

96. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 2000. v.4, p.A279-A285.