

Lúcia Helena Moreira Lírio Matias dos Santos

MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE

**ANÁLISE AUTOMÁTICA DE GENTAMICINA
POR QUIMILUMINESCÊNCIA**

Universidade do Porto

Faculdade de Farmácia

Porto, 2008

Lúcia Helena Moreira Lírio Matias dos Santos

Licenciada em Ciências Farmacêuticas pela
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE

**ANÁLISE AUTOMÁTICA DE GENTAMICINA
POR QUIMILUMINESCÊNCIA**

Trabalho de Dissertação apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto para a
obtenção do Grau de Mestre em Controlo de Qualidade

Orientação: Professora Doutora Conceição Montenegro



Porto, 2008

**Trabalho realizado no serviço de Química-Física
da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Conceição Montenegro e ao Doutor Adriano Fachini pela sua supervisão, orientação e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Alberto Araújo pelo apoio e disponibilidade no acompanhamento do trabalho laboratorial.

Ao Professor Doutor Boaventura Reis, do CENA (Universidade Federal de São Paulo), pela ajuda prestada no desenvolvimento do sistema de fluxo multicomutado e respectivo programa informático utilizado neste trabalho.

À Fundação AstraZeneca pela bolsa de Mestrado concedida.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, e em especial ao serviço de Química-Física, por me ter proporcionado as condições necessárias à realização desta dissertação.

A todos os meus colegas de laboratório: André, David, Diana, Joana Ribeiro, Marieta, Célia, Karine, Cláudia, Eunice, Mafalda, Rita, Rodrigo, Hugo, Cristina, Sofia, Marisa, Ana, Joana Carvalhido; a todos agradeço a simpatia, amizade e ajuda prestada durante esta etapa da minha vida.

À D. Belmira e à D. Manuela agradeço o apoio, simpatia e amizade demonstrada durante os meses que passei no Serviço de Química-Física da FFUP.

Aos meus pais que sempre me incentivaram e apoiaram.

A todos um muito obrigado!

RESUMO

No âmbito desta dissertação foi desenvolvido um método analítico para a determinação de gentamicina, associando-se uma técnica de fluxo não segmentado (a multicomutação) com a detecção por quimiluminescência. A metodologia desenvolvida foi aplicada à análise de produtos farmacêuticos, disponíveis no mercado português.

A determinação da gentamicina baseou-se no seu efeito inibidor sobre a emissão de radiação obtida pela reacção de quimiluminescência entre o luminol e o hipoclorito de sódio, em meio alcalino. O luminol era oxidado pelo hipoclorito, emitindo radiação na zona do visível (425 nm). Na presença da gentamicina, este antibiótico reagia com o hipoclorito, diminuindo a quantidade de oxidante disponível para reagir com o luminol, o que originava a diminuição da intensidade da radiação emitida.

A utilização de um sistema de fluxo multicomutado permitiu recorrer à amostragem binária, assegurando-se uma rápida homogeneização da zona de reacção e um controlo flexível da dispersão, porque a inserção da amostra e reagentes era baseada no tempo e, por isso, facilmente controlável.

O método analítico proposto permitiu uma rápida quantificação da gentamicina em diferentes formulações farmacêuticas (colírios, soluções injectáveis e pomadas oftálmicas), constituindo uma alternativa vantajosa aos procedimentos tradicionalmente usados no controlo de qualidade deste tipo de produtos pela indústria farmacêutica, pois requer um baixo consumo de reagentes e produz um volume reduzido de resíduos.

ABSTRACT

In this work, an analytical method was developed for the determination of gentamicin, using a non segmented flow system (multicommutation) with chemiluminescence detection. The developed methodology was applied to the analysis of pharmaceutical products, available in the portuguese market.

The gentamicin determination was based on its ability to inhibit the emission of light by the chemiluminescence reaction of luminol with sodium hypochlorite, in alkaline medium. The oxidation of luminol by hypochlorite causes the emission of radiation belonging to the visible spectrum (425 nm). In the presence of gentamicin, this will react with hypochlorite, reducing the quantity of oxidant available to react with luminol, producing a decrease in the emission of light.

The use of a multicommutated flow system allowed employing the binary sampling, ensuring a quick homogeneization of the reaction zone and a flexible control of dispersion, since the insertion of sample and reagents was based in time, which was easily controled.

The developed analytical methodology allowed the rapid quantification of gentamicin in different pharmaceutical formulations (eye drops, injections and eye creams), which could represent an advantageous alternative to the quality control of these kinds of products for the pharmaceutical industry, because require low quantities of reagents and produce small volumes of residues.

Lista de Siglas e Abreviaturas

AAC – Enzima N-acetiltransferase

AAD – Enzima O-adeniltransferase

ADN – Ácido desoxirribonucleico

APH – Enzima O-fosfotransferase

ARN – Ácido ribonucleico

CE – Electroforese capilar

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELSD – Detector evaporativo por dispersão de luz

FIA – Análise por injeção em fluxo

GC – Cromatografia gasosa

GC-MS – Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-MS – Cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

LC – Cromatografia líquida

MCFIA – Análise por injeção em fluxo por multicomutação

MPFS – Sistema de fluxo por multi-impulsão

MSFIA – Análise por injeção em fluxo por multi-seringa

OPA – *o*-ftaldeído

PVP – Polivinilpirrolidona

SIA – Análise por injeção sequencial

UV – Ultra-violeta

Vis – Visível

ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Embora a presente dissertação esteja enquadrada no âmbito da química analítica, sendo eu farmacêutica optei por dar, especialmente no capítulo relativo à introdução, uma visão mais alargada focando alguns aspectos que se relacionam não só com o medicamento, nomeadamente aspectos bacteriológicos e farmacológicos, mas também com a sua utilização. Assim, a tese está organizada do seguinte modo:

– No Capítulo 1 fazem-se algumas referências ao medicamento para o qual foi desenvolvido o método analítico, detalhando aspectos relacionados não só com as suas propriedades químicas, mas também farmacológicas, bacteriológicas, toxicológicas e utilidade terapêutica deste antibiótico. Paralelamente abordam-se os métodos automáticos de análise, onde se enquadra o método analítico proposto, dando-se particular destaque à análise por injeção em fluxo por multicomutação e também à aplicação da quimiluminescência como método de detecção.

– No Capítulo 2 descrevem-se os procedimentos experimentais para a execução do trabalho laboratorial.

– No Capítulo 3 apresentam-se os resultados obtidos e realiza-se a sua análise crítica.

– Por fim, no Capítulo 4 fazem-se algumas considerações gerais sobre a metodologia proposta e os resultados obtidos com a mesma.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Breve resumo histórico	2
1.2 – Antibióticos	5
1.2.1 – Generalidades	5
1.2.2 – Mecanismos de resistência aos antibióticos	6
1.3 – Aminoglicosídeos	8
1.3.1 – Origem	8
1.3.2 – Estrutura química e características	9
1.3.3 – Mecanismo de acção	10
1.3.4 – Espectro de acção	11
1.3.5 – Mecanismos de resistência bacteriana	11
1.3.6 – Toxicidade	13
1.3.7 – Utilização terapêutica	14
1.3.7.1 – Utilização em medicina humana	14
1.3.7.2 – Utilização em medicina veterinária	15
1.4 – Gentamicina	16
1.5 – Métodos de quantificação da gentamicina em formulações farmacêuticas	18
1.6 – Métodos automáticos de análise	22
1.6.1 – Métodos de fluxo não segmentados	22
1.7 – Análise por Injecção em Fluxo por Multicomutação (MCFIA)	29
1.8 – Quimiluminescência	33
1.8.1 – Aspectos gerais	33
1.8.2 – Luminol	37
1.9 – Métodos de fluxo com detecção quimiluminométrica para a análise de gentamicina	38
2. PARTE EXPERIMENTAL	40
2.1 – Reagentes e soluções	41
2.1.1 – Preparação das amostras	42
2.1.2 – Preparação das soluções para o estudo dos interferentes	43
2.2 – Instrumentação e equipamentos	44

2.3 – Procedimento em fluxo	48
2.4 – Otimização da montagem de fluxo e validação do método analítico desenvolvido	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1 – Introdução	54
3.1.1 – Otimização dos parâmetros físico-químicos	54
3.1.2 – Avaliação dos interferentes	61
3.1.3 – Análise de formulações farmacêuticas	63
4. CONSIDERAÇÕES GERAIS	68
5. BIBLIOGRAFIA	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estrutura dos aminociclítóis presentes nos aminoglicosídeos	9
Figura 1.2 – Locais de inativação enzimática em vários aminoglicosídeos	13
Figura 1.3 – Estrutura química dos principais componentes da gentamicina	16
Figura 1.4 – Esquema representativo de um sistema FIA	24
Figura 1.5 – Esquema representativo de um sistema SIA	25
Figura 1.6 – Esquema representativo de um sistema de MSFIA	27
Figura 1.7 – Esquema representativo de um sistema de MPFS	28
Figura 1.8 – Esquema representativo de um sistema de MCFIA	29
Figura 1.9 – Representação esquemática da amostragem binária	30
Figura 1.10 – Esquema representativo dos tipos de reacções quimiluminométricas	34
Figura 1.11 – Estrutura química do luminol	37
Figura 2.1 – Bomba peristáltica Gilson Minipuls 3	45
Figura 2.2 – Válvula solenóide de três vias da NResearch Inc.	45
Figura 2.3 – Representação esquemática do luminómetro mostrando os pontos de mistura das soluções	46
Figura 2.4 – Esquema da montagem de fluxo multicomutado utilizada na determinação de gentamicina em formulações farmacêuticas	48
Figura 2.5 – Representação esquemática da posição das válvulas solenóides durante o ciclo analítico	50
Figura 3.1 – Influência do número de ciclos de intercalação de amostra e solução de hipoclorito no sinal analítico	56
Figura 3.2 – Influência do caudal no sinal analítico referente ao branco	57
Figura 3.3 – Influência da concentração da solução de hipoclorito de sódio no sinal analítico	58
Figura 3.4 – Influência do pH da solução de hipoclorito de sódio no sinal analítico	58
Figura 3.5 – Influência da concentração da solução de luminol no sinal analítico ...	59
Figura 3.6 – Influência do pH da solução de luminol no sinal analítico	60
Figura 3.7 – Registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Aminoglicosídeos com maior utilidade na terapêutica, período em que foram descobertos e tipo de origem	8
Tabela 1.2 – Métodos de fluxo não segmentados mais utilizados e seu enquadramento histórico	23
Tabela 2.1 – Protocolo de operações do sistema de fluxo para a determinação de gentamicina em formulações farmacêuticas	50
Tabela 3.1 – Valores otimizados dos parâmetros analíticos	60
Tabela 3.2 – Síntese dos resultados obtidos na avaliação dos interferentes	62
Tabela 3.3 – Resultados da análise de colírios contendo gentamicina e dos ensaios de recuperação	64
Tabela 3.4 – Resultados da análise de soluções injectáveis contendo gentamicina e dos ensaios de recuperação	65
Tabela 3.5 – Resultados da análise de pomadas oftálmicas contendo gentamicina e dos ensaios de recuperação	66

1. INTRODUÇÃO

1.1- Breve resumo histórico

A primeira referência histórica à existência de microrganismos causadores de doenças infecciosas, sobretudo epidémicas, remonta ao século IV a.C., quando Hipócrates, o célebre físico e médico grego, falou pela primeira vez de “miasmas”, que descreveu como sendo partículas químicas que provinham dos pântanos e dos corpos em decomposição e que, eram espalhadas pelo ar, causando as epidemias. No século XV, quando uma vasta epidemia de peste bubónica devastou a Europa, esta teoria ainda subsistia, o que levou à utilização de numerosos “antimiasmáticos” tão fantasiosos como ineficazes. Mais tarde no século XVII, o conceito dos “miasmas” ainda se mantinha inalterado, tendo sido criados os mais engenhosos meios para os remover do ar contaminado ou para se protegerem contra eles. Assim, foram utilizados sinos e campainhas a soar no exterior das casas; pássaros que voavam no interior dos quartos para agitarem o ar; perfumes nos lenços, roupas, móveis e paredes; aranhas em recipientes abertos nos quartos para que estes animais absorvessem os “miasmas”; amuletos com palavras mágicas; entre outros [1].

Contudo, se durante séculos a teoria hipocrática dos “miasmas” prevaleceu, ignorando-se a verdade que nela estava contida, houve quem a procurasse aprofundar ou encontrar compostos naturais e produtos químicos eficazes no combate às epidemias. Neste contexto salienta-se o caso de Fracastro, que em Verona, no ano de 1546, admitiu que os “miasmas” eram partículas de matéria viva com capacidade de se multiplicarem e disseminarem na atmosfera, aproximando-se, assim, da actual noção de bactéria e microrganismos afins [1]. Neste mesmo século, o médico Aureolus Paracelsus usou compostos de antimónio no tratamento geral das infecções e derivados de mercúrio no tratamento específico da sífilis [2].

Mais tarde, em 1683, Leeuwenhoek, um engenhoso comerciante de tecidos de Delft, comunicou à “Royal Society” ter observado, com um microscópio da sua invenção, minúsculos “animáculos” que pululavam em muitos produtos, incluindo os que resultavam da raspagem dos dentes, os quais eram, muito provavelmente, protozoários, fungos e mesmo bactérias [1]. É ainda durante o século XVII, que Thomas Sydenham utilizou a casca de cinchona no tratamento da malária, e que é introduzida a raiz de ipecacuanha para combater a disenteria amibiana [2].

No entanto, foi só em 1861, quando Pasteur demonstrou a impossibilidade de se observar a fermentação da urina e de soluções de sacarose se estas fossem previamente fervidas e protegidas do ar contaminante, que a teoria dos “miasmas” de Hipócrates foi definitivamente abandonada, surgindo assim a noção de esterilização. Este conceito teve um enorme impacto na terapêutica logo nos anos imediatos, com o cirurgião Joseph Lister, de Glasgow, que estudou o efeito inibitório de substâncias químicas sobre as bactérias, aplicando os seus conhecimentos directamente na medicina, ao utilizar o fenol para esterilizar os instrumentos cirúrgicos, diminuindo, assim, a taxa de mortalidade e morbidade associada às cirurgias. A ideia de que as infecções eram causadas por microrganismos estava instaurada e sabia-se, agora, que havia meios físicos e químicos para os combater [1-3].

Em 1876, na Alemanha, Koch dedicava-se ao estudo de infecções de animais e homens, quando identificou a primeira bactéria a ser conhecida – o bacilo do carbúnculo (*Bacillus anthracis*). Seis anos mais tarde, o mesmo cientista viria a identificar também o bacilo da tuberculose e, no ano seguinte, o vibrião colérico. Com estas descobertas iniciava-se a era da bacteriologia, abrindo-se novos horizontes, até então desconhecidos, para o conhecimento da fisiopatologia e da terapêutica das doenças infecciosas [1,2].

Em 1909, também na Alemanha, Paul Ehrlich e seus colaboradores descobriram o salvarsan, sendo utilizado no tratamento do triponossoma e outros protozoários. Em 1910, o mesmo cientista demonstrou a possibilidade de se utilizarem, com êxito, compostos orgânicos de arsénio contra a infecção do homem pelo treponema pálido (agente causador da sífilis), sendo esta terapia utilizada até 1940, altura em que foi substituída pela penicilina [2,3].

No entanto, só em 1935 é que nasce a quimioterapia antibacteriana sistémica, com a síntese do Prontosil, uma sulfonamida cujos efeitos e resultados foram estudados por Gerhard Domagk, o que lhe valeu o Prémio Nobel da Medicina em 1938. Contudo, foram precisos mais cinco anos, para Alexander Fleming descobrir a penicilina e dar-se, assim, início à era da antibioticoterapia. Seguiu-se a descoberta da estreptomina, a partir de culturas de *Streptomyces griseus*, em 1944, por Selman Waksman juntamente com o seu aluno Albert Schatz, sendo este o primeiro fármaco eficaz contra a tuberculose, pelo que recebeu o Prémio Nobel da Medicina em 1952. Waksman também isolou a neomicina, em 1948, bem como mais dezasseis antibióticos, embora a maior parte não tivesse utilidade clínica devido à sua elevada toxicidade [2,3].

Também é a Waksman que se deve a introdução do termo “antibiótico”, que veio substituir o antigo termo “antibiose”, que havia sido proposto por Vuillmein, em 1868, e que se referia ao antagonismo dos seres vivos em geral. O termo “antibiótico” foi redefinido, por Waksman, como uma substância produzida por microrganismos que antagoniza o desenvolvimento ou a vida de outros microrganismos, quando presente em altas diluições no meio bioquímico do corpo humano [3].

Nas décadas que se seguiram, a terapêutica antibacteriana foi largamente enriquecida, tanto pelo aparecimento de novos antibióticos (naturais e de síntese), bem como pelos impressionantes avanços feitos no conhecimento dos mecanismos de acção deste grupo de compostos, sobre as suas capacidades e limitações, e sobre as reacções por eles provocadas nos microrganismos. No entanto, quase após um século passado sobre o aparecimento do primeiro antibiótico, e tendo-se conseguido o controlo quase total das infecções bacterianas, a resistência bacteriana ainda é o principal desafio com que os cientistas se deparam [1].

1.2- Antibióticos

1.2.1- Generalidades

Os antibióticos são fármacos cuja finalidade é matar ou impedir a multiplicação de microrganismos patogénicos, que infectam organismos superiores, causando-lhes doença. Os antibióticos podem ter diferentes origens: serem produzidos por microrganismos, a maior parte das vezes fungos; serem obtidos através da modificação química da molécula de um antibiótico produzido por um microrganismo; por semi-síntese a partir de um núcleo fundamental de origem natural; ou por síntese completa.

Os antibióticos podem exercer a sua acção por dois modos de acção distintos, sendo eles: através da inibição da multiplicação bacteriana (acção bacteriostática); ou provocando a morte das bactérias (acção bactericida).

O mecanismo de acção dos antibióticos nem sempre está suficientemente esclarecido e, frequentemente, determinado antibiótico actua por diferentes mecanismos em diferentes fases do ciclo de vida das bactérias, dependendo da sua concentração. Os mecanismos de acção dos antibióticos podem-se enquadrar nos seguintes grupos [1]:

1) Inibição da síntese da parede bacteriana

Todos os compostos pertencentes a este grupo são bactericidas, e a sua acção só é exercida sobre o crescimento das bactérias. São exemplo de antibióticos pertencentes a este grupo as penicilinas e as cefalosporinas.

2) Modificação da permeabilidade da membrana citoplasmática

Todos os compostos pertencentes a este grupo são bactericidas e actuam tanto sobre as bactérias em repouso como sobre as bactérias em multiplicação. No entanto, o seu interesse clínico é praticamente nulo, pois estes antibióticos apresentam pouca especificidade, podendo também atingir a membrana citoplasmática das células do hospedeiro. São exemplo deste tipo de antibióticos os iónoforos, como a valinomicina; e os antibióticos polipeptídicos, cujo representante típico são as polimixinas, que se comportam como detergentes catiónicos, causando uma desorganização da membrana citoplasmática de forma a passarem iões para o exterior da célula.

3) Alteração da síntese dos ácidos nucleicos

Os antibióticos que inibem a síntese dos ácidos nucleicos podem actuar em diferentes fases da sua síntese. São exemplos de antibióticos pertencentes a este grupo: as quinolonas, que impedem a acção da girase do ADN; o metronidazol, que actua sobre o ADN, desintegrando-o, o que inibe a síntese de novas cadeias de ADN; a rifampicina, que inibe a polimerase da ARN dependente do ADN.

4) Inibição da síntese proteica por acção sobre os ribossomas

Os antibióticos pertencentes a este grupo inibem a síntese proteica por acção directa sobre os ribossomas, ligando-se às subunidades que os constituem. São exemplo de antibióticos pertencentes a este grupo: os aminoglicosídeos, as tetraciclínas e o cloranfenicol. No que se refere aos aminoglicosídeos, mais adiante descrever-se-à com detalhe o seu mecanismo de acção.

5) Inibição de diversas enzimas do metabolismo citoplasmático

Contrariamente ao que se passa nas células eucarióticas (hospedeiro), as células procarióticas (bactérias) não podem utilizar folatos pré-formados, tendo que os sintetizar. Sendo assim, há antibióticos, como as sulfonamidas e o trimetropim, que actuam no processo de síntese dos folatos realizado pelas bactérias, impedindo-o.

1.2.2- Mecanismos de resistência aos antibióticos

Os microrganismos patogénicos podem ter diferentes mecanismos bioquímicos que os tornam resistentes aos antibióticos, tais como:

- Enzimas microbianas inactivadoras dos antibióticos;
- Receptores microbianos com baixa afinidade para os antibióticos;
- Baixas concentrações intra-microbianas dos antibióticos, devido a uma permeabilidade reduzida da membrana citoplasmática e por transporte activo de saída;
- Vias metabólicas microbianas que substituem as vias inactivadas pelos antibióticos;

- Falta de biotransformação do antibiótico num metabolito activo pelo microrganismo.

As bactérias podem ser naturalmente resistentes a um determinado grupo de antibióticos, ou podem adquirir a informação dos mecanismos bioquímicos de resistência, quer por modificação dos ácidos nucleicos do seu cromossoma, quer por aquisição de material genético proveniente do exterior. O primeiro mecanismo é conhecido por mutação, e ocorre permanentemente, independentemente da bactéria estar na presença de um antibiótico, com um ritmo baixo de 1 para 10 milhões de divisões celulares. A resistência conferida por mutação é geralmente isolada, e refere-se a um só composto ou grupo de compostos semelhantes, sendo baixa a probabilidade de desenvolvimento de resistência a vários antibióticos [1,2,4].

Mas se a eficácia na produção e disseminação de estirpes bacterianas resistentes a diferentes antibióticos através da mutação é modesta, o mesmo não se passa com o outro mecanismo genético, que é capaz de conferir um bloco de múltiplas resistências e de as transmitir de uma bactéria para outra da mesma ou de diferente espécie, género e família. Muitas bactérias (patogénicas ou não) contêm plasmídeos, que são pequenas moléculas circulares de ADN extra-cromossómicas capazes de se autocopiarem independentemente do cromossoma, e que, por vezes, possuem informação genética capaz de tornar a bactéria resistente a um ou mais antibióticos (plasmídeos de resistência ou R) [2,4].

Esta capacidade dos plasmídeos difundirem resistência aos antibióticos é ainda alargada por um outro fenómeno. Alguns segmentos de ADN podem sofrer translocação ou transposição de um local da cadeia de ADN para outro, constituindo verdadeiros “genes saltitantes” designados por transposões. Quando estes genes possuem informação de mecanismos de resistência, os plasmídeos R que os recebem vão aumentar o número de resistências que transportam, tornando-se mais infecciosos.

Outro mecanismo de trocas genéticas é a transformação, em que fragmentos de ADN cromossómicos de uma bactéria dadora se integram nos cromossomas da célula receptora [1,4].

1.3- Aminoglicosídeos

Em 1944, Waksman e seus colaboradores isolaram a estreptomicina a partir de um actinomicete (*Streptomyces griseus*), iniciando-se assim a era dos antibióticos designados por aminoglicosídeos. Posteriormente, foram descobertos outros compostos quimicamente aparentados (ver a Tabela 1.1), constituindo-se um novo grupo de antibióticos, com características bastante homogêneas.

Tabela 1.1 – Aminoglicosídeos com maior utilidade na terapêutica, período em que foram descobertos e tipo de origem [5].

Aminoglicosídeo	Data	Origem
Estreptomicina	1944	Natural
Neomicina	1949	Natural
Canamicina	1957	Natural
Gentamicina	1963	Natural
Tobramicina	1967	Natural
Amicacina	1972	Semi-sintético
Netilmicina	1975	Semi-sintético

1.3.1- Origem

A maior parte dos aminoglicosídeos é de origem natural, sendo produzidos por vários microrganismos pertencentes à família das Actinobacteria (actinomicetes), nomeadamente membros dos géneros *Streptomyces* e *Micromonospora*. Estes organismos costumam produzir, simultaneamente, um determinado número de antibióticos estruturalmente relacionados, pelo que o produto terapêutico final poderá conter uma mistura de compostos activos. No entanto, há antibióticos aminoglicosídicos que são derivados semi-sintéticos de produtos de fermentação natural, como é o caso da amicacina e da netilmicina, derivados da canamicina A e da sisomicina, respectivamente. Hoje em dia, já se consegue realizar a síntese química de grande parte dos aminoglicosídeos, mas o processo de obtenção por via da fermentação continua a ser o mais económico para a sua produção [5,6].

1.3.2- Estrutura química e características

Os aminoglicosídeos são um grupo de antibióticos formados por dois ou mais açúcares aminados unidos por uma ligação glicosídica a uma hexose aminada (núcleo aminociclitol). Este aminociclitol é a 2-deoxiestreptamina em todos os aminoglicosídeos com interesse clínico, com a exceção da estreptomina, cuja hexose é a estreptidina (Figura 1.1) [5].

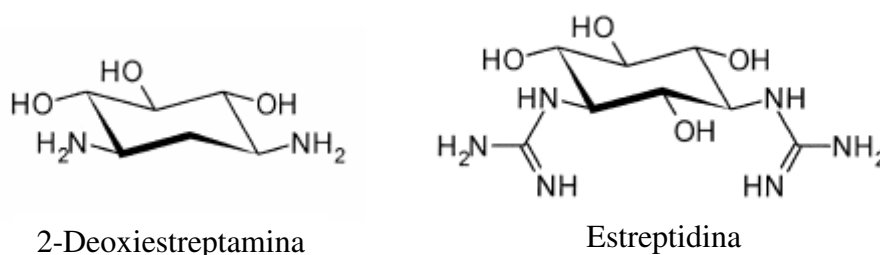


Figura 1.1 – Estrutura dos aminociclitolis presentes nos aminoglicosídeos (adaptado de [6]).

Estruturalmente, os aminoglicosídeos possuem um grande número de radicais amina (-NH) e hidroxilo (-OH), pelo que são polcatiões com características básicas e uma elevada polaridade. Estes antibióticos têm uma elevada solubilidade em água, são relativamente insolúveis em lípidos, e a sua actividade anti-microbiana é potenciada em meios alcalinos [7].

As características polares dos aminoglicosídeos fazem com que a sua absorção oral seja muito baixa (inferior a 1% da dose administrada), por isso após a sua administração, vão aparecer na sua quase totalidade nas fezes, na forma intacta, o que incapacita a obtenção de níveis sistémicos eficazes. Por outro lado, a via intramuscular permite obter rapidamente níveis sanguíneos terapêuticos [5].

A natureza catiónica dos aminoglicosídeos contribui para a sua actividade anti-microbiana. Devido às suas cargas positivas, estes antibióticos são capazes de se ligar aos lipopolissacarídeos da parede celular da bactéria, pois estes encontram-se carregados negativamente, bem como a uma grande variedade de moléculas aniónicas, como o ADN e os fosfolípidos, que se encontram na membrana celular ou no interior da bactéria. Infelizmente, o facto de os aminoglicosídeos se encontrarem carregados positivamente, a pH fisiológico, também contribui para a sua toxicidade, nomeadamente nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio da transmissão neuromuscular [7].

Os aminoglicosídeos são compostos metabolicamente estáveis, que são excretados na urina, na forma inalterada. Estes fármacos têm uma margem terapêutica estreita, pelo que é necessário realizar a monitorização da concentração destes antibióticos, principalmente em doentes com disfunção renal ou sujeitos a tratamentos prolongados (superior a 3 dias) [7].

1.3.3- Mecanismo de acção

Os aminoglicosídeos são agentes bactericidas, que actuam através da inibição da síntese proteica e da desintegração da membrana celular das bactérias. Este grupo de antibióticos exerce o seu efeito por um processo que envolve múltiplos passos. Primeiro, por serem compostos catiónicos, ligam-se a resíduos carregados negativamente que se encontram na membrana externa dos bacilos Gram-negativos, num processo passivo e que não depende de energia. Depois, o antibiótico difunde-se através das porinas existentes na membrana externa, entrando no espaço periplasmático. Uma vez no espaço periplasmático, para que sejam transportados através da membrana citoplasmática interna é necessária energia metabólica, fornecida pela cadeia respiratória, um processo dependente de oxigénio. Este transporte pode ser bloqueado por catiões divalentes (como o magnésio e o cálcio), por redução do pH e por aumento da osmolaridade. Após atravessarem a membrana citoplasmática interna, os aminoglicosídeos vão-se ligar de forma irreversível aos ribossomas da bactéria, inibindo, assim, a síntese proteica. O alvo intracelular primordial destes antibióticos é a subunidade 30S do ribossoma (ex. estreptomina), mas os aminoglicosídeos que contêm 2-deoxiestreptamina também têm a capacidade de se ligarem à subunidade 50S. A ligação dos aminoglicosídeos ao ribossoma leva à diminuição da velocidade da síntese proteica e a uma deficiente tradução do código genético, com síntese de proteínas anormais e, conseqüentemente, não funcionais, o que é letal para a bactéria. As proteínas anómalas produzidas podem ser incorporadas na membrana citoplasmática da bactéria, facilitando o transporte dos aminoglicosídeos. Esta modificação da membrana também poderá ser responsável pela perda de material citoplasmático (íões e proteínas), contribuindo para a morte da bactéria [5,7,8].

1.3.4- Espectro de acção

O espectro de acção dos aminoglicosídeos é bastante extenso, abrangendo tanto bactérias Gram-negativas como bactérias Gram-positivas.

O grande interesse terapêutico deste grupo de antibióticos resulta da sua actividade contra os bacilos Gram-negativos aeróbios, nomeadamente *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *P. aeruginosa* [5].

No que se refere às bactérias Gram-positivas, geralmente os aminoglicosídeos são menos activos. Quando usados em monoterapia, a sua actividade é inadequada contra *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, pelo que a sua utilidade clínica no tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas é limitada à combinação sinérgica entre os aminoglicosídeos e outros agentes anti-microbianos, como os antibióticos β -lactâmicos [7].

Em condições de anaerobiose, estes compostos são inactivos, tanto em relação aos anaeróbios obrigatórios como aos facultativos, possivelmente porque, nestas condições, o seu transporte através da membrana citoplasmática é bloqueado [5,6].

1.3.5- Mecanismos de resistência bacteriana

A resistência das bactérias aos aminoglicosídeos pode ser natural ou adquirida, estando esta relacionada com o facto de, por não possuírem cadeia respiratória, não existir energia suficiente para os transportar através da membrana citoplasmática das células bacterianas. As bactérias anaeróbias facultativas apresentam uma maior resistência aos aminoglicosídeos quando crescem em anaerobiose do que quando crescem na presença de oxigénio. Outros microrganismos, como os *Streptococcus spp.* e os *Enterococcus spp.*, têm parede celular que funciona como uma barreira de permeabilidade, sendo também naturalmente resistentes aos aminoglicosídeos. Nestes casos, a utilização conjunta de um antibiótico que iniba a síntese da parede celular, como é o caso dos β -lactâmicos e a vancomicina, facilita a entrada do aminoglicosídeo na célula bacteriana [7].

As resistências bacterianas adquiridas podem ocorrer por três mecanismos distintos, nomeadamente alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática,

inativação enzimática e falta de afinidade para o local de acção do antibiótico, o ribossoma.

A alteração da permeabilidade da membrana dos bacilos Gram-negativos confere resistência cruzada a todos os aminoglicosídeos e, muitas vezes, a outros grupos de antibióticos. Os microrganismos resistentes apresentam alterações no seu potencial transmembranar e/ou na cadeia respiratória. Bactérias Gram-negativas, como a *P. aeruginosa*, são resistentes aos aminoglicosídeos, devido a alterações na estrutura das porinas presentes na sua membrana citoplasmática, o que contribuiu para uma diminuição da permeabilidade da mesma [2,7].

No entanto, a forma mais comum e importante de resistência aos aminoglicosídeos resulta de modificações induzidas no antibiótico por enzimas presentes no espaço periplasmático. As moléculas dos antibióticos podem ser alteradas através da acetilação dos grupos amina, mediada por N-acetiltransferases (AAC); da fosforilação dos grupos hidroxilo, mediada por O-fosfotransferases (APH); ou da nucleotidilação dos grupos hidroxilo, mediada por O-nucleotidiltransferases, na maioria dos casos O-adeniltransferases (AAD). A transformação química dos grupos hidroxilo e amina presentes nas moléculas dos aminoglicosídeos reduz a sua afinidade para o alvo ribossomal e possivelmente inibe a sua incorporação na membrana citoplasmática, o que confere uma elevada resistência a este grupo de antibióticos, como se demonstra na Figura 1.2. Os genes que codificam para estas enzimas podem ser encontrados tanto em plasmídeos como em transposões, podendo ser transferidos entre diferentes estirpes bacterianas da mesma espécie ou de espécies diferentes, disseminando-se, assim, a resistência bacteriana a este grupo de antibióticos. A expressão destes genes é constitutiva, pelo que a produção destas enzimas ocorre tanto na presença como na ausência do antibiótico [2,5,7,9].

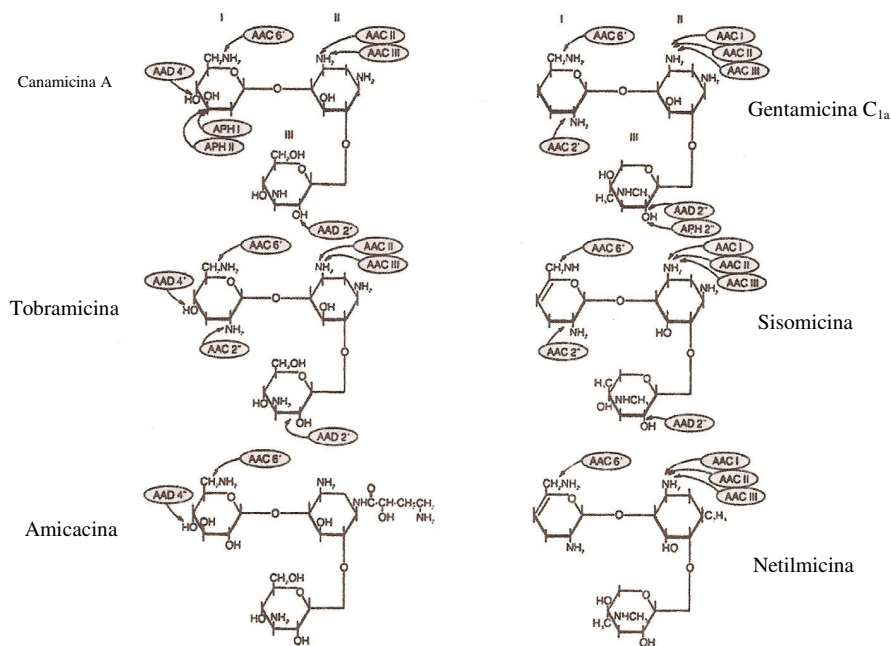


Figura 1.2 – Locais de inativação enzimática em vários aminoglicosídeos (adaptado de [2]).

Por fim pode ocorrer a alteração do ribossoma, devido a uma mutação na subunidade 30S do mesmo. No entanto, este mecanismo de resistência só é relevante para a estreptomicina, pois os outros aminoglicosídeos podem ligar-se às duas subunidades do ribossoma (30S e 50S), não sendo afectados por este mecanismo de resistência [5,7].

1.3.6- Toxicidade

O interesse clínico dos aminoglicosídeos encontra-se limitado devido aos seus efeitos tóxicos, dos quais os mais graves são a nefrotoxicidade, a ototoxicidade e a neurotoxicidade.

A nefrotoxicidade resulta da acumulação de aminoglicosídeos no tubo proximal e deve-se a necrose tubular aguda, em especial do tubo proximal, com redução da capacidade de concentração da urina, seguida de redução da filtração glomerular. A toxicidade renal é dependente da dose de antibiótico e geralmente reversível se a terapêutica for suspensa precocemente. Dos aminoglicosídeos usados por via sistémica, o menos nefrotóxico é a estreptomicina, tendo os restantes antibióticos deste grupo uma

nefrotoxicidade muito semelhante. No entanto, a gentamicina é mais nefrotóxica do que a amicacina, canamicina ou netilmicina. É de realçar que os efeitos nefrotóxicos se encontram potenciados por determinados factores, como: idade, disfunção renal, tratamentos prolongados, dose terapêutica, distância temporal entre dois regimes terapêuticos e administração concomitante com outros fármacos nefrotóxicos [2,5].

Os aminoglicosídeos tendem a acumular-se nos fluidos do ouvido interno revelando efeitos ototóxicos. Normalmente, a ototoxicidade é irreversível e pode-se manifestar como lesão vestibular e/ou coclear. Da lesão coclear resulta, inicialmente, um zumbido de frequência elevada, seguido de surdez progressiva, quase sempre irreversível. Já a lesão vestibular leva ao aparecimento de náuseas, vômitos, tonturas, vertigens e perturbações do equilíbrio, sintomatologia que de início se encontra sempre presente, mas que mais tarde, com a regressão da lesão ou a passagem à fase crónica, poderá desaparecer completamente ou ficar limitada a ataxia que apenas surge ao fechar os olhos. A ototoxicidade está relacionada com a dose total de antibiótico que é administrada. Quando os aminoglicosídeos são utilizados por via sistémica, a lesão predominante é a vestibular no caso da estreptomina e da gentamicina e é a coclear para a canamicina, netilmicina e amicacina [5].

Quando administrados em doses elevadas, por via intra-muscular ou intravenosa, os aminoglicosídeos podem causar bloqueios neuromusculares do tipo não despolarizante, levando a paragens respiratórias. Constituem grupos de alto risco os doentes com medicação relaxante muscular ou com miastenia grave. São também exemplo de outras manifestações de neurotoxicidade mais raras, a nevrite óptica, parestesias, cefaleias e irritabilidade [2].

1.3.7- Utilização terapêutica

1.3.7.1 - Utilização em medicina humana

Os aminoglicosídeos são antibióticos com grande interesse clínico, devido ao seu efeito bactericida e espectro de acção predominante sobre bactérias Gram-negativas. O seu maior interesse reside na eficácia sobre os bacilos Gram-negativos aeróbios,

particularmente as *Enterobacteriaceae* e a *P. aeruginosa*. Geralmente são utilizados em associação com antibióticos β -lactâmicos no tratamento de infecções graves [5].

Os aminoglicosídeos deverão ser utilizados preferencialmente no tratamento de doenças graves, tais como: infecções do tracto respiratório, preferencialmente associados a um β -lactâmico; infecções intra-abdominais e infecções pélvicas, associados à clindamicina ou ao metronidazol; infecções urinárias complicadas; quadros de septicemia, associados à piperacilina, ceftazidima, imipenemo ou monobactâmicos; endocardites por enterococos; infecções da pele, tecidos moles e ósseas; e meningites (administração intra-tecal), embora, neste caso, seja preferível recorrer a outros grupos de antibióticos.

Em doentes hospitalizados com respiração assistida e em doentes algaliados, os aminoglicosídeos têm sido usados profilacticamente para diminuir os riscos de infecção respiratória e urinária, respectivamente.

A administração de aminoglicosídeos por via oral, isoladamente ou em associação a outros antibióticos (vancomicina e outros, ou anti-fúngicos), tem sido utilizada na descontaminação gastrointestinal para a prevenção de infecções em doentes neutropénicos.

Por fim, os aminoglicosídeos também podem ser utilizados topicamente no tratamento de doentes queimados, conseguindo-se boas absorções e excelentes níveis séricos [2].

1.3.7.2- Utilização em medicina veterinária

Na medicina veterinária e na produção animal, os aminoglicosídeos são largamente usados no tratamento de infecções bacterianas, como por exemplo enterites bacterianas (diarreia no gado) e mastites, e têm sido adicionados às rações dadas aos animais por profilaxia e como promotores de crescimento. Cabe ressaltar que actualmente a utilização de aminoglicosídeos como promotores de crescimento está proibida na União Europeia. São exemplo de antibióticos utilizados para este fim a gentamicina, a neomicina e a estreptomicina [6].

1.4- Gentamicina

Em 1963, Weinstein e seus colaboradores isolaram um novo antibiótico de largo espectro – a gentamicina – a partir de duas espécies de bactérias pertencentes ao género *Micromonospora* [10].

A gentamicina C é uma mistura de várias substâncias, apresentando três componentes principais estruturalmente relacionados, designados de gentamicina C₁, C_{1a} e C₂, e dois componentes menores, a gentamicina C_{2a} e C_{2b} (Figura 1.3).

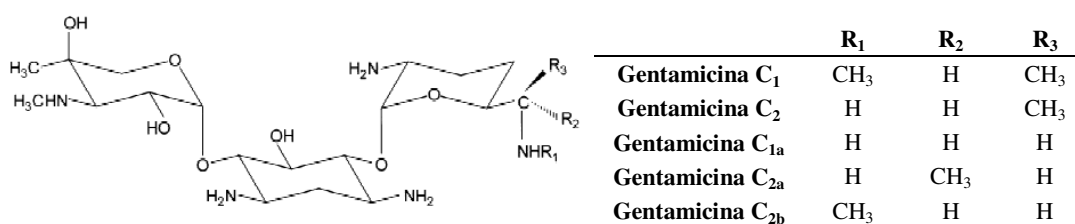


Figura 1.3 – Estrutura química dos principais componentes da gentamicina.

Este antibiótico é produzido por fermentação da *Micromonospora purpurea* ou da *M. echinospora*. Os componentes da gentamicina C são pseudo-trissacarídeos, contendo garosamina e purpurosamina ligadas glicosidicamente à 2-deoxiestreptamina. Quanto à posição desta ligação, a gentamicina apresenta uma estrutura de 2-deoxiestreptamina 4,6-dissubstituída [11-13].

A gentamicina existe na forma de sais de sulfato, apresentando-se como um pó branco ou quase branco, higroscópico. É facilmente solúvel em água, moderadamente solúvel em metanol, etanol e acetona, e praticamente insolúvel em benzeno e hidrocarbonetos halogenados [14].

Quanto à sua actividade, a gentamicina é um antibiótico de largo espectro, activo contra *S. aureus* e bacilos Gram-negativos, incluindo a *P. aeruginosa*. Tem moderada actividade contra *Streptococcus spp.* e em associação com a penicilina, tem uma acção sinérgica contra *E. faecalis* e *E. faecium*. Não se verificam diferenças detectáveis no espectro de acção dos diferentes componentes principais da gentamicina [2,15]. Relativamente ao mecanismo de acção, este é igual para os três componentes principais da gentamicina C, ligando-se à subunidade 30S do ribossoma no mesmo local, mas com diferentes afinidades. A gentamicina C_{1a} liga-se à subunidade 30S com uma afinidade ligeiramente superior à da C₂, enquanto a C₁ é o componente com menor afinidade para

o ribossoma [16]. Tal como todos os outros aminoglicosídeos, não é absorvida por via oral, pelo que, terapêuticamente, é administrada por via intra-muscular ou via intravenosa. A sua eliminação faz-se por via renal, por filtração glomerular, atingindo elevadas concentrações urinárias, sem sofrer alterações metabólicas [2].

Actualmente, devido a ser um antibiótico de largo espectro, a gentamicina é usada em várias situações de doença, nomeadamente no tratamento de infecções sistémicas graves, provocadas por bacilos Gram-negativos, podendo ser usada isoladamente no tratamento de infecções urinárias ou tularémia, ou em associação a outros antibióticos, como por exemplo a ampicilina e a penicilina, as isoxazolilpenicilinas, a doxiciclina e a ceftriaxona, estendendo-se assim a sua acção terapêutica ao tratamento de endocardites por enterococos, ao tratamento de infecções provocadas por *S. aureus* e *S. epidermidis*, ao tratamento da brucelose humana e ao tratamento de endocardites causada por estirpes de *Streptococcus spp.* susceptíveis à penicilina, respectivamente [2,6,17]. Topicamente, a gentamicina também tem sido utilizada no tratamento de infecções de pele e de queratoconjuntivites, quando provocadas por bacilos Gram-negativos [2]. Por ter um espectro de acção alargado é geralmente um antibiótico de primeira escolha no combate a infecções nosocomiais graves causadas por *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa* em hospitais com baixa resistência a este grupo de antibióticos [17].

Devido à sua larga utilização na terapêutica, tem-se assistido a um aumento no número de estirpes bacterianas resistentes à gentamicina, principalmente no que se refere a infecções nosocomiais [2].

Presentemente, em Portugal, a gentamicina encontra-se comercializada em diferentes formulações farmacêuticas, sendo de salientar as soluções injectáveis, os colírios, as pomadas oftálmicas e os cremes. Este antibiótico pode ser veiculado sozinho ou em associação com outras substâncias activas, como por exemplo a indometacina e a dexametasona [18].

1.5- Métodos de quantificação da gentamicina em formulações farmacêuticas

A determinação da gentamicina tem sido efectuada nas mais variadas matrizes, principalmente em amostras biológicas [19-23], formulações farmacêuticas [24-39], alimentos [40-44] e amostras ambientais [45,46]. No caso particular dos produtos farmacêuticos, este composto aparece sob a forma de sal, nomeadamente sulfato de gentamicina. No entanto, tal como foi referido anteriormente, este antibiótico é constituído por uma mistura de vários componentes que não possuem grupos cromóforos nem fluoróforos, o que dificulta a sua determinação directa através de métodos colorimétricos, habitualmente utilizados na maioria das monografias oficiais para controlo de compostos farmacêuticos.

Estão descritas diferentes metodologias para a análise do sulfato de gentamicina nas mais variadas formulações farmacêuticas, permitindo a realização de estudos de estabilidade, controlo de qualidade das mesmas [24,35] e atestar a autenticidade de um determinado produto farmacêutico [26,27,30]. Na maior parte dos casos, o analito em estudo encontra-se em concentrações razoavelmente elevadas, numa matriz que embora complexa, não exige na maioria das situações o recurso a processos de extracção da amostra [6].

Sendo a gentamicina uma mistura de vários componentes, a indústria farmacêutica adoptou como análise de rotina a determinação das percentagens relativas dos seus componentes principais. A Farmacopeia Portuguesa [47] (bem como a Farmacopeia Europeia [48]) descreve para o efeito uma metodologia de cromatografia líquida de fase reversa com detecção amperométrica, recorrendo a um eléctrodo de ouro, para a análise da matéria-prima. Já a Farmacopeia Americana [49], descreve um método de cromatografia líquida de fase reversa com detecção por ultra-violeta, após derivatização pré-coluna da gentamicina com *o*-ftaldeído (OPA).

Na Farmacopeia Americana e para formulações farmacêuticas contendo sulfato de gentamicina, estabelece-se como método oficial, os ensaios microbiológicos [49]. Estes podem ser realizados por dois métodos distintos, nomeadamente por difusão em placa de agar ou por ensaio turbidimétrico [50]. No primeiro colocam-se discos de papel impregnados com soluções diluídas do antibiótico em estudo, numa placa de Petri com meio de cultura sólido, previamente semeado com uma determinada bactéria, avaliando-

se o diâmetro da zona de inibição do crescimento da mesma, em torno do disco de papel. Já o ensaio turbidimétrico utiliza um meio de cultura líquido inoculado com uma determinada bactéria, onde se vai colocar a solução diluída do antibiótico em estudo. Após incubação, mede-se a absorvância da “mistura” presente no tubo para avaliar o crescimento da bactéria. No entanto, este tipo de ensaios apresenta várias limitações, sendo de salientar a sua baixa sensibilidade, falta de precisão e de especificidade, além de que são metodologias morosas e com elevada variabilidade [6,24].

Para além do que está fixado nas monografias oficiais, no que concerne à determinação de gentamicina em formulações farmacêuticas têm sido propostos outros procedimentos baseados em técnicas cromatográficas com diferentes métodos de detecção acoplados. Neste âmbito destacam-se a cromatografia de troca iónica com detecção por espectrofotometria na região do ultra-violeta, após derivatização pré-coluna com OPA [25], cromatografia líquida (LC) com detecção electroquímica pulsada, com um eléctrodo de ouro [26] e LC com detecção por detector evaporativo por dispersão de luz (ELSD) [24]. Também a electroforese capilar (CE) com detecção por espectrofotometria na região do ultra-violeta [27,28] tem sido utilizada na análise deste antibiótico em medicamentos, usando detecção espectrofotométrica na região do UV após derivatização pré-capilar da gentamicina com o OPA e o ácido mercaptoacético [29], ou detecção por gradiente de potencial [30] ou detecção electroquímica com eléctrodos de cobre [31]. Todos os procedimentos referidos envolvem equipamento de elevado custo e na maioria das situações os reagentes utilizados, sobretudo os de derivatização (OPA, ácido mercaptoacético), são altamente tóxicos.

Para além das técnicas separativas referidas, foram igualmente propostos procedimentos electroanalíticos envolvendo a potenciometria com eléctrodos selectivos de iões [32], e amperometria usando um biosensor que incorpora simultaneamente a enzima colinesterase e anticorpos anti-gentamicina [33]. Embora estas técnicas sejam mais económicas do que as descritas anteriormente, são por vezes sujeitas a interferências provocadas por compostos quimicamente aparentados ou por produtos de degradação do composto original.

Baseada na detecção óptica, a gentamicina foi quantificada em formulações farmacêuticas recorrendo à fluorimetria. O método baseia-se na derivatização da gentamicina com o 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, numa mistura de 50% (v/v) metanol e tampão fosfato pH 7,2 [34] e o produto de reacção formado era detectado

após radiação de excitação a 465 nm e emissão aos 530 nm. Foi igualmente referida outra metodologia baseada na detecção do produto resultante da reacção entre os iões európio e a gentamicina que potenciava a intensidade da radiação fluorescente emitida a 616 nm pelos iões európio [35].

A gentamicina foi igualmente quantificada recorrendo-se a métodos espectrofotométricos. Wang *et al.* [36] desenvolveram um método em que após reacção do analito com o *p*-dimetilaminobenzaldeído, numa solução de ácido acético/tampão acetato, o complexo formado, de cor amarela, possuía um máximo de absorção a 405 nm. El-Didamony *et al.* [37] determinaram este composto por espectrofotometria indirecta. O método era baseado na oxidação do antibiótico por permanganato de potássio, em meio ácido, determinando-se seguidamente o excesso de oxidante que não participava na reacção e correlacionando-o com a concentração de gentamicina.

Relativamente a metodologias de análise em fluxo, estão descritos métodos de análise por injeção em fluxo (FIA) para a determinação de gentamicina em formulações farmacêuticas, utilizando a quimiluminescência como método de detecção. Li *et al.* [38] utilizaram a reacção de quimiluminescência directa entre a gentamicina e o cobalto (III), na presença de ácido sulfúrico, sendo o cobalto (III) electrogerado em linha. Utilizando uma metodologia semelhante, onde o peroxioxalato actuava como espécie emissora de quimiluminescência na presença do imidazol como catalisador da reacção [39], Ramos-Fernández *et al.* analisaram a gentamicina em soluções injectáveis, colírios e pomadas oftálmicas. No entanto, a necessidade de se efectuar uma pré-derivatização com *o*-ftaldeído da espécie a medir, limita a sua aplicação, sobretudo sob o ponto de vista ambiental.

Para além dos métodos de determinação de gentamicina em produtos farmacêuticos, também têm sido descritos outros com aplicação em produtos alimentares de origem animal, como por exemplo, o leite e a carne (partes edíveis). Nestes produtos, a gentamicina está presente porque são habitualmente usados na profilaxia de certas doenças nos animais de criação. A sua determinação bem como a presença de resíduos ou eventualmente outros antibióticos em matrizes alimentares é muito importante, uma vez que se tratam de substâncias com elevada nefrotoxicidade e ototoxicidade. Este tipo de avaliação é de todo importante para as agências governamentais de modo a garantirem a segurança alimentar e o cumprimento da

legislação de cada país, no que se refere à utilização de fármacos na produção animal [6,51].

Os ensaios microbiológicos, também referidos na literatura, são utilizados preferencialmente como testes de “screening” para a análise de resíduos de antibióticos, podendo detectar a presença de diferentes classes de antibióticos [52-55]. Estes ensaios embora sejam baratos e simples de realizar, necessitam de uma confirmação dos resultados positivos obtidos através de metodologias mais sofisticadas, como é o caso da cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC-MS), ou mais comumente, a cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa (HPLC-MS).

Recentemente, também tem crescido o interesse na detecção de antibióticos em amostras ambientais, uma vez que a sua presença exerce um efeito selectivo para a formação de estirpes bacterianas resistentes a antibióticos. Este facto é de particular relevância no que concerne às bactérias patogénicas [46].

1.6- Métodos automáticos de análise

Nas últimas décadas tem-se assistido a um crescente interesse por parte dos laboratórios analíticos, no desenvolvimento de métodos automáticos de análise com o intuito de simplificarem os procedimentos analíticos, de forma a realizarem um número cada vez maior de determinações analíticas, mantendo os custos em valores aceitáveis. A implementação de metodologias automáticas traz algumas vantagens, pois permite reduzir os custos analíticos por via da diminuição do número de operadores envolvido e também pela redução do consumo de reagentes e amostra. Este último aspecto tem impacto sob o ponto de vista ambiental, já que é possível reduzir a produção de resíduos perigosos e diminuir a exposição dos operadores do laboratório a produtos químicos tóxicos [56].

A automação laboratorial teve início na segunda metade do século XX, mesmo antes de se recorrer à utilização do computador. Nesta época foi introduzido o conceito de análise em fluxo, surgindo os sistemas de fluxo contínuo, que provaram ser excelentes instrumentos para a gestão de soluções, permitindo a implementação de procedimentos automáticos em várias etapas do processamento da amostra (por exemplo: controlo de diluições, separação e concentração em linha, adição de reagentes, mistura, e controlo do tempo da amostragem). Os sistemas de fluxo mostravam ser uma metodologia vantajosa, pois conseguiam evitar a contaminação da amostra pelo ambiente (e vice-versa); reduziam o consumo de reagentes e de amostra, bem como a produção de resíduos; aumentavam o ritmo de amostragem; melhoravam a precisão das medidas analíticas; e o sinal analítico era monitorizado continuamente ao longo do tempo. Nestes sistemas, cada amostra ou produto da reacção originava um sinal transiente, cuja altura máxima ou área era relacionada com o parâmetro que se pretendia avaliar [57,58].

1.6.1- Métodos de fluxo não segmentados

Ao longo dos últimos anos, os métodos de fluxo não segmentados têm sido os processos de análise automática que mais atenção tem merecido por parte da

comunidade científica. Tal facto deve-se a estas metodologias exibirem uma elevada versatilidade e simplicidade, sendo o custo das montagens muito acessível.

O conceito de análise em fluxo não segmentado surgiu em 1975, para definir metodologias em que pequenos volumes de amostra, rigorosamente medidos, eram introduzidos de forma intermitente num fluído transportador, o qual procedia ao seu encaminhamento até ao detector, sem que houvesse recurso à intercalação de bolhas de ar. Na altura da detecção não era necessário atingir-se um equilíbrio físico e químico, sendo a quantificação possível porque os padrões e as amostras eram sujeitos a níveis de dispersão idênticos e eram processados de maneira semelhante. Este tipo de métodos tinha a vantagem de ser rápido e oferecer uma boa exactidão e precisão de resultados.

Contudo, à parte destes métodos, foram desenvolvidos outros mais recentemente, como é o caso da Análise por Injecção Sequencial (SIA) e da multicomutação, que apresentam a vantagem de não necessitarem de reconfiguração física do sistema, bastando apenas dar instruções via computador para se conseguir alterar as condições hidrodinâmicas e se efectuar uma optimização rápida das variáveis que lhe estão implícitas. Assim, só era necessário proceder ao estudo das variáveis químicas para que com montagens simples se pudesse analisar diferentes amostras num curto espaço de tempo.

A crescente evolução tecnológica levou ao aparecimento de vários métodos de análise em fluxo não segmentado (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Métodos de fluxo não segmentado mais utilizados e seu enquadramento histórico.

Método de Fluxo	Data	Proposto por	Ref.
Análise por Injecção em Fluxo (FIA)	1975	J. Ruzicka E.H. Hansen	59
Análise por Injecção Sequencial (SIA)	1990	J. Ruzicka G. Marshall	60
Análise por Injecção em Fluxo por Multicomutação (MCFIA)	1994	B.F. Reis e colaboradores	61
Análise por Injecção em Fluxo por Multi-seringa (MSFIA)	1999	V. Cerdà e colaboradores	62
Sistema de Fluxo por Multi-impulsão (MPFS)	2002	R.A.S. Lapa e colaboradores	63

O primeiro método de fluxo não segmentado a surgir foi a **Análise por Injecção em Fluxo** (FIA, do inglês “Flow Injection Analysis”) e tinha como principal característica o controlo da dispersão de um segmento de amostra intercalada num fluxo que o transporta até ao detector (Figura 1.4) [59]. A introdução desta técnica veio revolucionar o conceito de automação na análise química, pois permitia realizar determinações analíticas sem ter que se estabelecer um equilíbrio físico (não era necessária a homogeneização da amostra e reagentes/transportador) ou químico (a reacção não tinha que ser completa). O FIA tornou-se bastante popular, uma vez que permitiu a automação de procedimentos laboratoriais de rotina, de um modo simples e acessível, com redução do consumo da amostra e aumento do ritmo de amostragem [64].

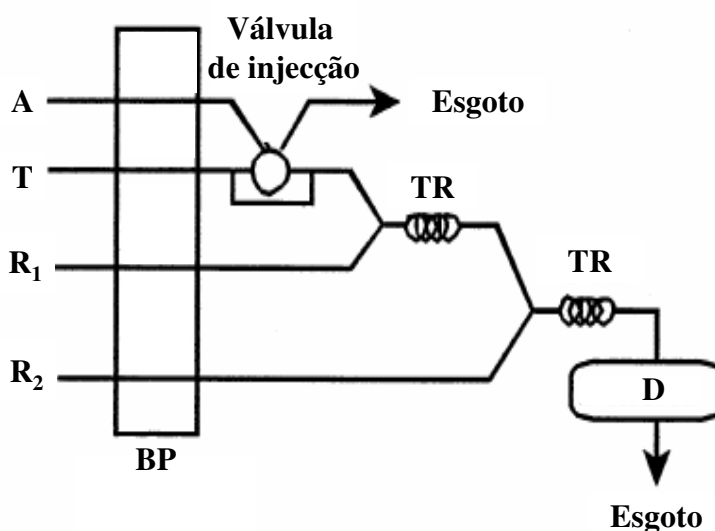


Figura 1.4 – Esquema representativo de um sistema FIA. A – Amostra; T – Solução transportadora; R₁ e R₂ – Reagentes; BP – Bomba peristáltica; TR – Tubo reactor; D – Detector (adaptado de [62]).

Com o acoplamento dos computadores aos sistemas de fluxo foi possível colmatar as deficiências do FIA em termos de autonomia. Surgiu assim a segunda geração da análise em fluxo, sendo designada por **Análise por Injecção Sequencial** (SIA, do inglês “Sequential Injection Analysis”) [60]. Este método baseia-se no princípio de controlo da dispersão e manipulação reprodutível da amostra, mas no qual o modo de funcionamento é baseado no conceito de fluxo programado [64].

Um sistema SIA engloba um dispositivo de propulsão bi-direccional e uma válvula selectora de multi-posição que são controlados, de modo sincronizado, por um

computador, sendo este componente responsável pela definição do caudal, volume e sentido (directo ou inverso) do fluxo das diferentes soluções (Figura 1.5). No decorrer do ciclo analítico, volumes precisos de amostra e reagente são sequencialmente aspirados através da válvula selectora de multi-posição, invertendo-se posteriormente o sentido do fluxo para transportar as soluções aspiradas para a zona de reacção. É durante este transporte que ocorre a mistura entre amostra e reagente, não só devido à inversão do sentido do fluxo mas também a processos de dispersão axial e radial, que ocorrem no processo de transporte [64].

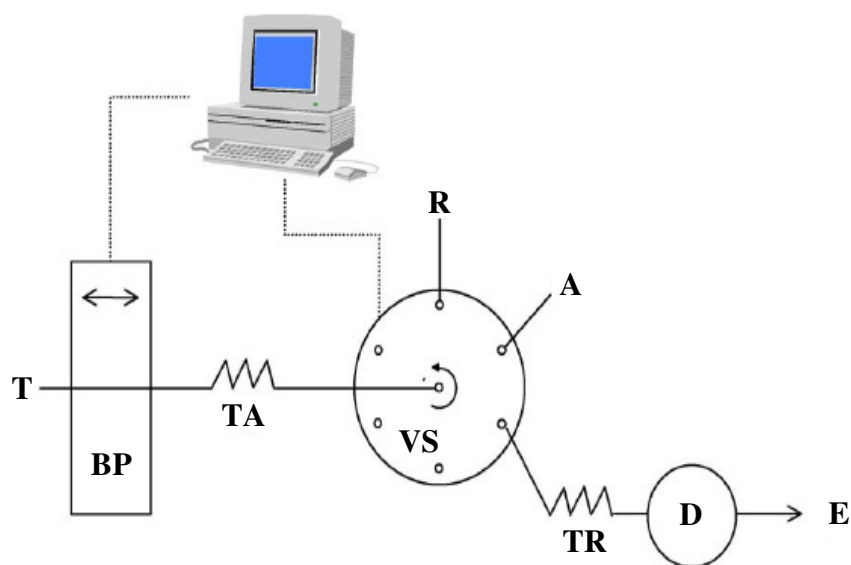


Figura 1.5 – Esquema representativo de um sistema SIA. T – Solução transportadora; BP – Bomba peristáltica; TA – Tubo de armazenamento; VS – Válvula selectora; R – Reagente; A – Amostra; TR – Tubo reactor; D – Detector; E – Esgoto (adaptado de [64]).

Comparativamente com o FIA, o SIA apresenta as seguintes vantagens: diminuição do consumo de reagentes e amostra; redução significativa da quantidade de resíduos produzida; possibilidade de se controlar o caudal apropriado de uma maneira mais reprodutível através do computador, bem como de todos os tempos utilizados em cada ciclo analítico, o que permite alterar facilmente os parâmetros experimentais. Estas características do SIA, tornam-no numa metodologia versátil, simples, robusta e que requer pouca manutenção.

Contudo, este método de fluxo também apresenta limitações, sendo de salientar a redução do ritmo de amostragem, em cerca de 30-50%, devido ao facto de ser

necessário um tempo de análise que corresponde à soma do tempo de aspiração sequencial das diferentes soluções envolvidas na reacção, com o tempo necessário para a ocorrência da mesma e medida do sinal analítico [64]. Assim, o desempenho do método SIA poderá ser afectado por uma ineficiente mistura da amostra e reagente por dispersão, uma vez que estes são colocados topo a topo [58].

Posteriormente, foram descritos outros métodos de fluxo resultantes de aperfeiçoamentos instrumentais, sendo conhecidos, no seu conjunto, como métodos de fluxo multicomutados. Estes caracterizam-se pelo baixo consumo de reagentes e amostra, juntamente com um elevado ritmo de amostragem.

A **Análise por Injecção em Fluxo por Multicomutação** (MCFIA, do inglês “Multicommutated Flow Injection Analysis”) foi proposta em 1994 [61] e surgiu como uma nova estratégia de manuseamento da amostra e introdução de reagentes num sistema de fluxo contínuo, recorrendo a válvulas solenóides. Este método de fluxo será abordado com maior detalhe na próxima secção já que foi a opção feita para o desenvolvimento do trabalho experimental.

Em contraste com os restantes métodos de fluxo multicomutados, a **Análise por Injecção em Fluxo por Multi-seringa** (MSFIA, do inglês “Multi-syringe Flow Injection Analysis”) baseia-se no uso de uma bureta automática como um dispositivo de multicanal, funcionando esta como o elemento propulsor e centro vital do MSFIA [62]. A bureta automática pode conter até quatro seringas, permitindo a sua movimentação simultânea, a partir de um único motor, e é controlada pelo “software” do computador. Uma válvula solenóide é colocada à saída de cada seringa, permitindo o acoplamento opcional para o sistema de fluxo ou para o reservatório das soluções (Figura 1.6) [65].

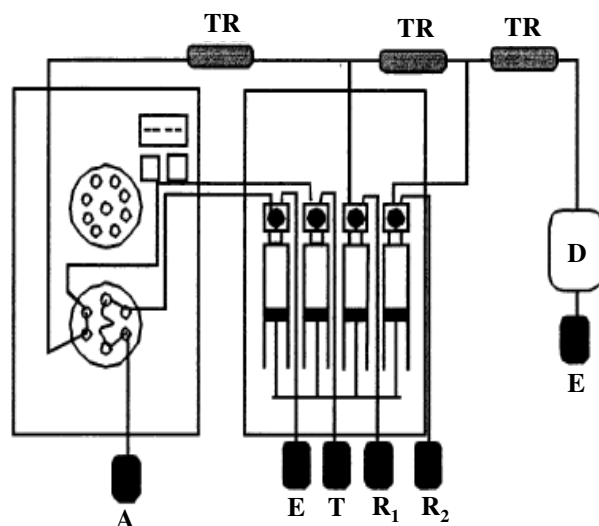


Figura 1.6 – Esquema representativo de um sistema de MSFIA. A – Amostra; E – Esgoto; T – Solução transportadora; R₁ e R₂ – Reagentes; TR – Tubo reactor; D – Detector (adaptado de [62]).

A principal vantagem associada ao MSFIA está relacionada com o facto de não necessitar de bombas peristálticas, e por isso poder usar reagentes mais agressivos, como os ácidos e bases fortes ou os solventes orgânicos, contornando-se o problema da incompatibilidade deste tipo de reagentes com os tubos poliméricos de impulsão usados nos sistemas descritos anteriormente, bem como a dificuldade inerente ao desgaste rápido que eles sofrem, devido à constante compressão e descompressão de que são alvo. Outras vantagens do MSFIA são a sua robustez, a elevada frequência de amostragem, evitam um consumo excessivo de reagentes e amostra, pois estes podem retornar ao reservatório quando não são necessários, e o facto de poder dispensar simultaneamente amostra e reagentes, facilitando a sua mistura. Já a principal desvantagem deste método de fluxo é a necessidade de descarregar periodicamente as soluções presentes nas seringas [62,65,66].

Mais recentemente, foi proposta uma nova estratégia para a implementação de procedimentos analíticos em fluxo, explorando o conceito de multi-impulsão – o **Sistema de Fluxo por Multi-impulsão** (MPFS, do inglês “Multi-pumping Flow System”) [63]. Este método baseia-se na utilização de várias micro-bombas solenóides como unidades propulsoras, sendo estas responsáveis pela introdução de amostra e reagentes, bem como mistura e transporte das soluções (Figura 1.7) [65]. A actuação das micro-bombas solenóides produz um fluxo pulsado, que se traduz numa cadeia contínua

de pequenos segmentos correspondentes a um determinado volume de solução resultante de cada pulso das micro-bombas. Cada pulso leva a um aumento do movimento caótico das soluções em todas as direcções, contribuindo para uma rápida e eficaz mistura entre amostra e reagentes [67].

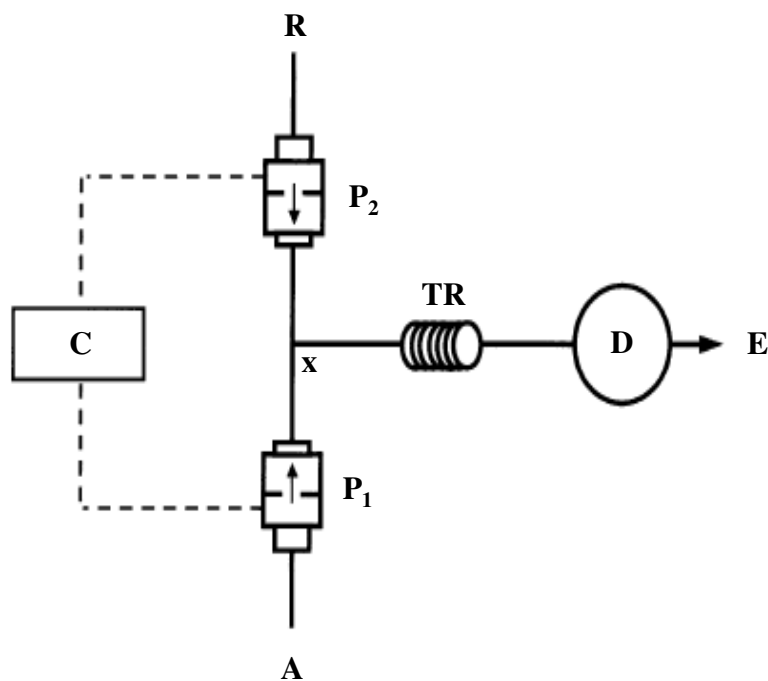


Figura 1.7 – Esquema representativo de um sistema de MPFS. P₁ e P₂ – Micro-bombas solenóides; A – Amostra; R – Reagente; C – Interface de controlo; X – Ponto de confluência; TR – Tubo reactor; D – Detector; E – Esgoto (adaptado de [63]).

O MPSF apresenta várias vantagens, sendo de destacar o facto de as micro-bombas solenóides terem sido desenhadas para proporcionar um percurso inerte para as soluções, de modo a poder utilizar tanto reagentes com elevado grau de pureza, como aqueles mais agressivos. Também a simplicidade do equipamento e a sua fácil concepção, operação e controlo são de destacar. A utilização de fluxo pulsado para obter uma rápida e eficaz mistura entre amostra e reagentes, e a utilização de volumes muito pequenos, permitindo assim uma redução do consumo de amostra e reagentes são outras das vantagens que lhe são apontadas [65].

1.7 - Análise por Injecção em Fluxo por Multicomutação (MCFIA)

Tal como foi referido anteriormente, a Análise por Injecção em Fluxo por Multicomutação (MCFIA) foi proposta como uma nova estratégia de manuseamento da amostra e introdução de reagentes num sistema de fluxo contínuo, recorrendo a um conjunto de válvulas solenóides, cada uma actuando como um comutador independente e cujas operações são controladas por computador [61].

Um sistema de multicomutação pode ser considerado como uma rede analítica que envolve a actuação de n dispositivos activos (ou n operações com um único dispositivo) numa única amostra permitindo o estabelecimento até 2^n estados (Figura 1.8).

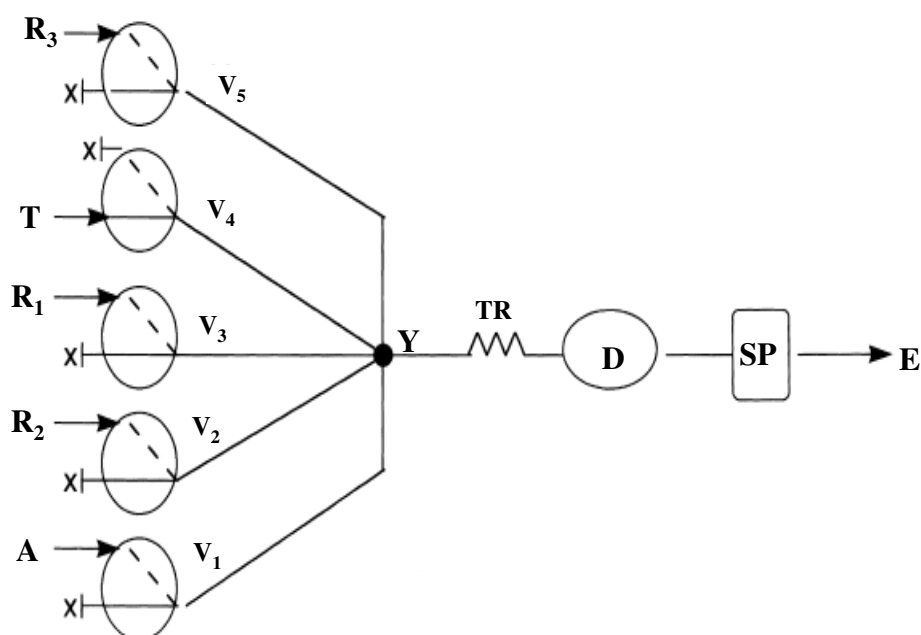


Figura 1.8 – Esquema representativo de um sistema MCFIA. A – Amostra; R₁ a R₃ – Reagentes; T – Solução transportadora; V₁ a V₅ – Válvulas solenóides de três vias; Y – Ponto de confluência; TR – Tubo reactor; D – Detector; SP – Sistema de propulsão; E – Esgoto (adaptado de [68]).

Apresenta diversos parâmetros de entrada (inlet) (por exemplo: amostra, reagentes), parâmetros do sistema introduzidos através do teclado do computador, e de

saída (outlet) (por exemplo: resultados, reciclagem de soluções, resíduos) que são, muitas vezes, interdependentes. Os passos analíticos requeridos para o processamento da amostra podem ser definidos através do “software” de controlo, podendo ser, caso necessário, modificados em tempo real [57].

A multicomutação recorre à utilização de válvulas solenóides, que são controladas por computador, para a inserção de amostra e reagente, substituindo os volumes de inserção por tempos de inserção. Estes dispositivos de inserção apresentam uma grande rapidez de comutação, o que lhe confere vantagens na forma de inserção das soluções, comparativamente aos outros dispositivos de injeção usados em outras técnicas de fluxo, nomeadamente FIA e SIA. Com base num controlo temporizado que pode ser facilmente alterado e ajustado, pequenas alíquotas de amostra (na ordem dos μL) são intercaladas com pequenas alíquotas de reagente, permitindo uma mais rápida homogeneização da zona de amostra e, conseqüentemente, um maior desenvolvimento da reacção [69]. Ao processo de intercalação de alíquotas de amostra e de reagente através de um único percurso analítico, onde a reacção química tem lugar, designa-se de amostragem binária (Figura 1.9).

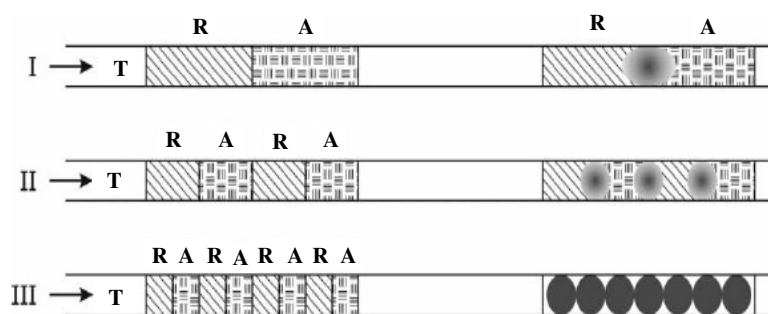


Figura 1.9 – Representação esquemática da amostragem binária. A – Amostra; R – Reagente; T – Solução transportadora. As zonas sombreadas representam as interfaces de mistura entre amostra e reagente. I – intercalação de pequenos segmentos de amostra e reagente; II – transporte das duas soluções; III – homogeneização da zona de amostragem (adaptado de [70]).

Na amostragem binária, a inserção da amostra é efectuada através da comutação da válvula solenóide entre as posições activada e desactivada, responsáveis pela inserção ou da amostra ou do reagente, com tempos de comutação extremamente curtos. Desta forma permite-se a intercalação de pequenas alíquotas de cada solução, que durante o seu transporte para o detector sofrem dispersão mútua das interfaces,

resultando na rápida obtenção de uma mistura homogénea com baixa dispersão da amostra. A eficiência da mistura é largamente afectada pelo tamanho das alíquotas, sendo tanto maior quanto menor for o seu volume. Assim que as alíquotas de amostra e reagente estejam dentro do sistema analítico, o fluxo destas soluções pára e apenas a solução transportadora circula novamente [70,71]. A inserção de n pares de amostra/reagente resulta no estabelecimento de $2^n - 1$ interfaces, onde a mistura ocorre por dispersão axial. Contrariamente à maior parte dos sistemas de fluxo, na multicomutação a interacção entre a amostra e os reagentes começa na zona de amostragem, aumentando o tempo de reacção, sem afectar a frequência de amostragem [57].

A utilização de pequenas redes de fluxo com válvulas solenóides a funcionarem como interruptores, controladas através do “software”, fez com que as potencialidades da análise em fluxo contínuo aumentassem drasticamente. A multicomutação apresenta várias vantagens, sendo de destacar: (i) a miniaturização do sistema de fluxo, devido ao reduzido tamanho das válvulas solenóides e das interfaces electrónicas, o que permitiu o desenvolvimento de equipamentos compactos e portáteis, passíveis de serem utilizados em análises “in situ”; (ii) o consumo reduzido de amostra e reagentes e (iii) boa reprodutibilidade.

Estes sistemas de fluxo são simples, económicos e versáteis; apresentando um elevado grau de automatização, sendo possível alterar todas as variáveis que incidem directamente sobre os perfis de dispersão, sem haver a necessidade da reconfiguração física do sistema [57,69].

Ainda é de salientar que a multicomutação é capaz de um desempenho analítico semelhante ao do SIA, com a vantagem de permitir uma mistura entre amostra e reagente mais rápida e eficiente, uma vez que a velocidade de comutação das válvulas solenóides é superior. Além disso a multicomutação apresenta um ritmo de amostragem mais elevado, graças ao facto da reacção química poder ter início logo na fase de amostragem, para além dos custos da montagem analítica serem inferiores.

Contudo, a multicomutação também apresenta algumas limitações, como por exemplo: as válvulas solenóides de três vias actuam como interruptores e, quando se encontram na posição OFF, a solução está a recircular de volta para o recipiente que contem a solução, logo o sistema de propulsão deve ser colocado preferencialmente atrás das válvulas solenóides a aspirar as soluções. Outra limitação desta metodologia é a escassez de equipamento para controlar as válvulas solenóides que se encontra

disponível comercialmente, principalmente interfaces electrónicas e “software”. Isto reflecte-se no facto de grande parte das aplicações de multicomutação publicadas, utilizarem dispositivos analíticos e “software” construídos no próprio laboratório [69].

1.8- Quimiluminescência

1.8.1- Aspectos Gerais

Desde a Antiguidade que o fenómeno da luminescência é conhecido na Natureza. As primeiras observações deste fenómeno foram realizadas em organismos vivos que emitem luz, como pirilampos, bactérias, fungos, peixes ou insectos.

A primeira referência ao fenómeno da quimiluminescência, como sendo a emissão de luz produzida por uma reacção química, remonta a 1877, tendo sido observado por Radziszewski, ao descobrir que a lofina emitia luz verde por reacção com o oxigénio, na presença de uma base forte. Contudo o termo “quimiluminescência” só viria a ser introduzido em 1888, por Wiedemann, que classificou o fenómeno da luminescência em seis tipos diferentes, consoante a forma de excitação [72].

A exploração da quimiluminescência para fins analíticos apenas se iniciou na década de 70 para reacções em fase gasosa e, na década seguinte, para reacções em fase líquida. Desde então, o número de reacções que produzem quimiluminescência descritas na literatura tem vindo a aumentar, com aplicações analíticas nas mais variadas áreas, como biomédica, alimentar, ambiental e toxicológica [72].

A quimiluminescência é definida como a emissão de radiação electromagnética (ultra-violeta, visível ou infra-vermelho) resultante de uma reacção química. O fenómeno pode ser observado quando um dos intermediários ou produtos da reacção é formado num estado electronicamente excitado, que pode emitir radiação ao regressar ao estado fundamental, ou transferir a sua energia para outra molécula, que depois emitirá radiação [73].

De um modo geral, a quimiluminescência pode ser gerada por dois mecanismos distintos [72,73], como se pode observar no esquema da Figura 1.10:

– **Quimiluminescência directa:** em que dois reagentes, normalmente um substrato e um oxidante, na presença de um co-factor, reagem originando um produto, do qual uma fracção será formada num estado electronicamente excitado e que vai regressar ao estado fundamental com emissão de um fotão.

– **Quimiluminescência indirecta:** baseia-se num processo de transferência de energia da espécie excitada para um fluoróforo que depois emite radiação. Através deste processo, moléculas incapazes de produzirem quimiluminescência directamente

transferem o seu excesso de energia para um fluoróforo que por sua vez fica num estado electronicamente excitado, regressando ao estado fundamental com emissão de um fóton.

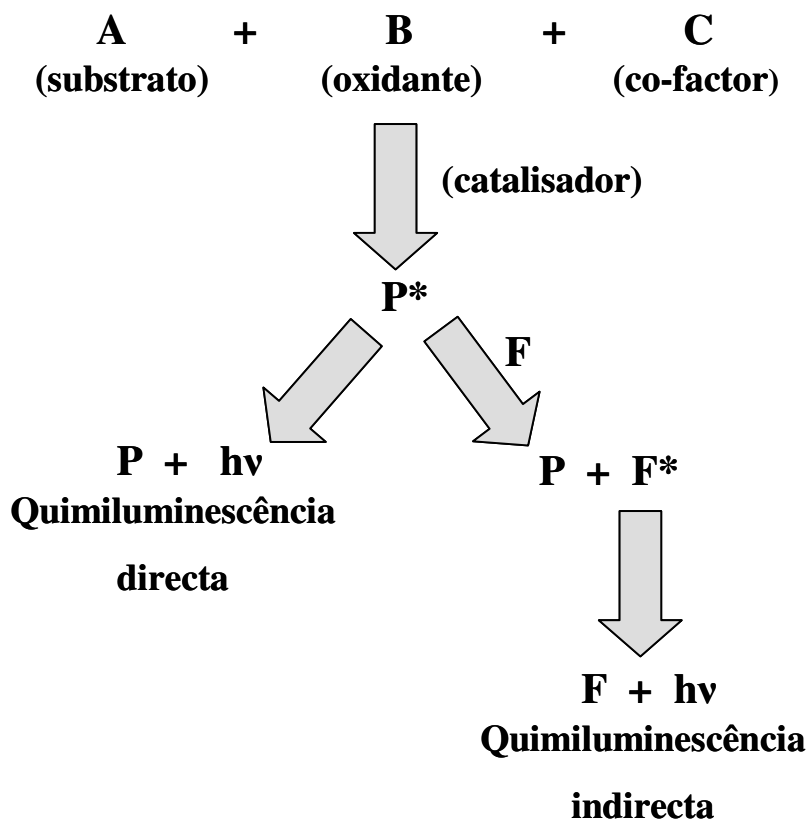


Figura 1.10 – Esquema representativo dos tipos de reacções quimiluminométricas (adaptado de [74]).

Para uma reacção química emitir radiação tem que cumprir certos requisitos. Em primeiro lugar a reacção deve ser exotérmica, de maneira a produzir energia suficiente para formar uma espécie num estado electronicamente excitado, pois a criação deste estado e a geração de quimiluminescência na zona da região do visível requer cerca de 40 a 70 Kcal mol⁻¹. A ocorrência de quimiluminescência está assim limitada a reacções exotérmicas, como as reacções redox que usam oxigénio, peróxido de hidrogénio ou oxidantes com potência similar. Além disso, o meio reaccional tem de ser favorável para canalizar a energia para a formação de um estado electronicamente excitado. E por fim, a emissão de um fóton tem que ser o processo de desactivação do produto excitado relativamente a outros processos competitivos não radiantes que surgem em menor proporção [72]. Relativamente à quimiluminescência indirecta, também a eficiência de

transferência de energia das espécies excitadas para o fluoróforo e a eficiência de fluorescência devem ser elevadas.

Nos processos de luminescência, a intensidade da emissão de fótons depende da eficiência na geração de moléculas no estado excitado, a qual é representada pela eficiência quântica ou rendimento quântico, e pela velocidade da reacção. Em relação à quimiluminescência, a intensidade pode ser expressa do seguinte modo:

$$I_{CL} = \Phi_{CL} \frac{-dA}{dt} \quad (\text{Eq. 1})$$

em que I_{CL} representa a intensidade de emissão de quimiluminescência, em fótons/segundo, Φ_{CL} , o rendimento quântico da reacção e $-dA/dt$, a velocidade a que o precursor A é consumido.

O rendimento quântico é expresso como o produto de duas eficiências:

$$\Phi_{CL} = \Phi_{ex} \Phi_L \quad (\text{Eq. 2})$$

onde Φ_{ex} é a eficiência da produção de espécies electronicamente excitadas e Φ_L é a eficiência de luminescência das espécies luminescentes. No caso da quimiluminescência indirecta, o Φ_{ex} também inclui a eficiência do processo de transferência de energia. Normalmente, valores elevados de rendimento quântico estão associados a reacções de bioluminescência, enquanto a maior parte das reacções de quimiluminescência utilizadas com fins analíticos apresenta Φ_{CL} entre os 0,001 e os 0,1.

As determinações quimiluminométricas são fortemente influenciadas por factores experimentais que afectam o rendimento quântico e a velocidade da reacção, sendo de salientar a estrutura química do precursor quimiluminogénico, a temperatura, o pH, a força iónica, o solvente e a composição da solução. Este tipo de reacções depende essencialmente da concentração dos reagentes envolvidos, podendo por isso ser utilizadas em análises quantitativas, já que a intensidade da emissão de radiação é proporcional à concentração de qualquer um dos reagentes envolvidos na reacção. Esta técnica é versátil e permite a determinação de um largo espectro de compostos. São exemplo disso os substratos ou precursores de quimiluminescência, responsáveis pela ocorrência do estado excitado, os oxidantes, algumas espécies que afectam a velocidade ou eficiência da reacção, nomeadamente catalisadores (enzimas ou iões metálicos) ou inibidores (substâncias redutoras que inibem a emissão de radiação). No caso da

quimiluminescência indirecta, algumas espécies que não entram directamente na reacção (fluoróforos), mas que podem reagir com outros compostos em reacções conjugadas originando um produto que intervém na reacção, sendo exemplo disso as espécies que podem ser derivatizadas com precursores quimiluminogénicos ou fluoróforos, podendo assim ser determinadas tanto por quimiluminescência directa como por quimiluminescência indirecta [72].

As técnicas quimiluminométricas apresentam várias vantagens, sendo de salientar a simplicidade e baixo custo do equipamento requerido, essencialmente devido à simplificação do sistema óptico, uma vez que não necessita de uma fonte de radiação externa, os baixos limites de detecção conseguidos com alguns dos sistemas e a possibilidade de se aplicar este método de detecção a um vasto número de espécies naturalmente fluorescentes ou a fluoróforos formados após reacções de derivatização.

A quimiluminescência é também uma técnica muito versátil, pois, como foi referido anteriormente, permite a determinação de várias espécies que participam directa ou indirectamente na reacção quimiluminométrica. Consoante a natureza do analito e da reacção envolvida, o aumento ou diminuição da intensidade da radiação emitida é directamente proporcional à concentração do analito. Contudo, tal como outras técnicas de detecção, também a quimiluminescência exhibe algumas limitações, sendo de destacar que a emissão de radiação está dependente de vários factores externos, tendo estes que ser controlados. Também pelo facto de que um reagente de quimiluminescência não reage exclusivamente com um analito, a selectividade atribuída a estas técnicas é relativamente reduzida. Por outro lado, a emissão de radiação não é constante durante uma reacção, variando ao longo do tempo (o sinal é transiente). Este perfil de radiação emitida versus tempo pode variar consoante o sistema quimiluminométrico considerado e o tempo de semi-vida do produto no estado excitado, podendo oscilar entre décimas de segundo até minutos. É por isso necessário garantir que a detecção seja efectuada durante um período de tempo rigorosamente definido e reprodutível. A necessidade de se ter que derivatizar a espécie em análise para a conseguir determinar através deste método de detecção, é outra das limitações apontadas a este tipo de detecção.

Para finalizar é de salientar que a quimiluminescência pode ser acoplada, como método de detecção, a técnicas separativas como a cromatografia, a electroforese capilar ou imunoensaios, permitindo conjugar a elevada selectividade destas técnicas com os

baixos limites de detecção proporcionados por este método de detecção, alargando assim o seu campo de aplicação.

1.8.2- Luminol

O melhor exemplo de uma reacção de quimiluminescência directa é a oxidação do luminol (5-amino-2,3-di-hidroftalazina-1,4-diona) (Figura 1.11) pelo peróxido de hidrogénio, em meio alcalino.

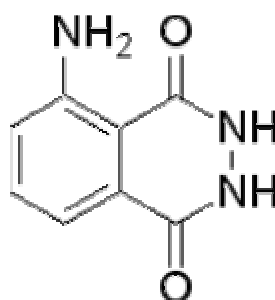


Figura 1.11 – Estrutura química do luminol.

A reacção de oxidação do luminol foi descoberta por Albrecht em 1928 [75] e envolve a sua oxidação em meio alcalino, produzindo o 3-aminoftalato no estado excitado, o qual emite radiação. A emissão da radiação ocorre na zona do visível, cerca dos 425 nm, correspondendo a uma luz azul característica.

Na reacção de quimiluminescência do luminol, o oxidante mais utilizado é o peróxido de hidrogénio. No entanto, oxidantes como o permanganato, o hipoclorito ou o iodo também podem ser usados. A reacção é catalisada por iões metálicos, como o ferro (II), o cobre (II), o cobalto (II), ferricianeto, alguns metalocomplexos (hemoglobina, hemina) e enzimas (por exemplo: peroxidases).

Esta reacção tem sido utilizada para a determinação de catalisadores, como iões metálicos [76,77] ou enzimas, certos oxidantes [78], inibidores ou substâncias que são facilmente oxidadas e são determinadas indirectamente através da medida da diminuição da emissão de radiação resultante da reacção de quimiluminescência [79,80].

1.9 – Métodos de fluxo com detecção quimiluminométrica para a análise de gentamicina

Várias reacções de quimiluminescência foram adaptadas para puderem ser utilizadas juntamente com métodos de fluxo, nomeadamente métodos de fluxo contínuo não segmentado, o que permitiu a determinação de uma grande variedade de analitos, como por exemplo a amónia [79], o carvedilol [80], a fluoxetina [81], sulfonamidas [82], a morfina [83], catecolaminas [84], a glucose [85], o ácido láctico [85] e a penicilina [85], de um modo reprodutível, conseguindo-se assegurar a relação entre a intensidade da radiação medida e a concentração do analito.

Nos métodos de fluxo contínuo não segmentados, a amostra é injectada no interior de tubagem de diâmetro reduzido e misturada com os reagentes de quimiluminescência na proximidade do detector. Esta zona de reacção é encaminhada para a célula de fluxo, colocada em frente à janela do fotomultiplicador, para a detecção da emissão da radiação. A sensibilidade deste tipo de detecção pode ser optimizado, controlando-se certas variáveis experimentais, como a dimensão do reactor, o caudal, a temperatura, o pH e a concentração dos reagentes.

Os métodos de fluxo acoplados com detector de quimiluminescência apresentam a vantagem de poderem tornar-se num equipamento compacto e de baixo custo, permitindo uma mistura rápida e reprodutível de amostra e reagentes, resultando em intensidades de emissão de quimiluminescência reprodutíveis [86]. Com esta metodologia consegue-se uma frequência de amostragem elevada, que pode ser da ordem das 65 [80], 120 [79,82,83] ou 136 [81] determinações por hora, por exemplo.

Como foi referido anteriormente, a quimiluminescência é um método de detecção eficaz para a determinação de muitos compostos, nomeadamente fármacos.

Na literatura encontram-se descritos dois métodos analíticos com detecção quimiluminométrica para a determinação da gentamicina [38,39]. Um baseia-se na reacção directa da gentamicina com o cobalto (III), em meio ácido [38], no entanto apresenta a desvantagem de se ter que electrogerar em linha o cobalto (III), devido a este oxidante ser muito instável, o que aumenta o custo da montagem utilizada. Já o outro método emprega o peroxioxalato como espécie emissora de quimiluminescência na presença do imidazol como catalizador da reacção [39]. Contudo, para a gentamicina

poder participar nesta reacção, tem que ser previamente derivatizada, de modo a adquirir grupos fluoróforos. A etapa de derivatização constitui uma desvantagem desta metodologia, pois requer a utilização de reagentes tóxicos (*o*-ftaldeído) que são nocivos para o homem e para o ambiente.

Sendo assim, a nossa proposta foi desenvolver um método de fluxo multicomutado com detecção por quimiluminescência que fosse rápido, económico e amigo do ambiente. O método desenvolvido baseou-se na capacidade que a gentamicina tem de inibir a reacção de oxidação do luminol pelo hipoclorito de sódio, em meio alcalino. Como este fármaco possui diversos grupos amina passíveis de sofrer oxidação, a sua presença contribui para inibir a referida reacção de quimiluminescência, já que parte do hipoclorito é consumido na oxidação dos grupos amina da gentamicina [87,88]. Este efeito traduz-se num decréscimo do sinal quimiluminométrico.

Como a reacção de quimiluminescência utilizada é muito rápida (na ordem dos milissegundos), decidiu-se associar esta técnica de detecção a um sistema de fluxo, nomeadamente à multicomutação, uma vez que esta associação permitiu a utilização de pequenos volumes de amostra e reagentes, a mistura das soluções envolvidas na reacção ocorria rapidamente, devido a se poder utilizar a amostragem binária, estabelecendo-se assim múltiplas interfaces entre amostra e reagentes, favorecendo-se a ocorrência da reacção química. Por fim é de realçar que o equipamento empregue no trabalho experimental desta dissertação é simples, compacto e de baixo custo.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1- Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados na preparação das soluções eram de qualidade analítica, sendo usados sem qualquer tratamento ou purificação adicional.

A água empregue na preparação das soluções era ultra-pura, com uma condutividade específica inferior a $0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$. Para evitar a formação de bolhas de ar no interior da tubagem do sistema de fluxo multicomutado, a água era previamente fervida antes de cada utilização.

Uma solução de luminol $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ era preparada dissolvendo 22,2 mg deste sólido (Fluka[®]) em 25 ml de carbonato de sódio $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ com pH ajustado a 9,2. Esta solução era conservada no frigorífico. A partir dela era preparada, diariamente, a solução de trabalho de concentração $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, por diluição rigorosa da mais concentrada, em carbonato de sódio $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ com pH ajustado a 9,2.

A solução de hipoclorito de sódio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ era preparada por diluição de outra mais concentrada disponível no mercado (Fluka[®]) em 25 ml de tampão carbonato pH 9,5. Esta solução era diluída rigorosamente no mesmo tampão para preparar 500 ml de solução de trabalho $1,7 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

Tanto as soluções de hipoclorito de sódio como as de luminol, por serem fotossensíveis, eram guardadas ao abrigo da luz.

Semanalmente era avaliada a concentração da solução comercial de hipoclorito de sódio. Para isso preparava-se uma solução aquosa a 1% (v/v) a partir da solução comercial, ajustava-se o pH a 6,2 com uma solução de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ e media-se a absorvância da mesma a 235 nm [89].

A solução stock de gentamicina, de concentração 100 mg l^{-1} , era preparada, diariamente, através da dissolução de 5 mg de sulfato de gentamicina (Sigma-Aldrich[®]) em 50 ml de água ultra-pura. As soluções padrão utilizadas para traçar as curvas de calibração eram preparadas a partir de diluições rigorosas da solução “stock” com água ultra-pura. Todas as soluções de trabalho com diferentes concentrações eram preparadas diariamente.

2.1.1- Preparação das amostras

A metodologia desenvolvida foi aplicada à análise de diferentes formulações farmacêuticas contendo gentamicina disponíveis no mercado português. Para tal analisaram-se os colírios Gentocil[®] (Laboratório Edol), Ophtagram[®] (Bausch & Lomb, S.A.), Indobiotic[®] (Bausch & Lomb, S.A.), Dexamytrex[®] Ophtiole (Angelini Farmacêutica, Lda.) e [®]Colircusí Gentadexa (Alcon Portugal); os injectáveis Gentamicina Labesfal 80 mg/2 ml (Labesfal) e Garalone[®] 80 mg/ml (Schering-Plough Farma Lda.); e as pomadas oftálmicas Gentocil[®] (Laboratório Edol), Ophtagram[®] (Bausch & Lomb, S.A.) e Dexamytrex[®] (Angelini Farmacêutica, Lda.).

A preparação das amostras é variável de acordo com o tipo de formulação em causa. Assim, para a análise de colírios diluía-se rigorosamente 1 ml de colírio com 25 ml de água. Em seguida, media-se rigorosamente 1 ml desta solução diluída para um balão volumétrico de 100 ml e perfazia-se o volume com água. As soluções injectáveis de gentamicina comercialmente disponíveis contêm elevados teores de bissulfito de sódio, como conservante. Na medida em que este composto se revelou uma fonte de interferência procedeu-se à sua eliminação prévia, segundo a metodologia proposta por Amorim *et al.* [90]. Para tal media-se 1 ml do injectável para um gobelé e adicionava-se 14 ml de água e 100 µl de ácido clorídrico concentrado. Borbulhava-se azoto na solução durante 15 minutos e depois acertava-se o pH com hidróxido de sódio diluído até pH 7,0. Transferia-se esta solução para um balão volumétrico de 100 ml e perfazia-se o volume com água. Em seguida, diluía-se rigorosamente 100 µl desta solução num balão volumétrico de 100 ml com água.

Para a análise das pomadas oftálmicas utilizou-se o procedimento descrito por Ramos-Fernández *et al.* [39]. Pesava-se 1,0 g de pomada oftálmica e dissolvia-se em 80 ml de água. Aquecia-se a 70 °C durante 10 minutos e deixava-se arrefecer até à temperatura ambiente. Em seguida filtrava-se, por gravidade, a solução utilizando para o efeito papel de filtro. Diluía-se os 80 ml de filtrado obtidos com água num balão volumétrico de 100 ml e depois pipetavam-se 2 ml desta solução para um balão volumétrico de 50 ml, perfazendo-se o volume com água.

2.1.2- Preparação das soluções para o estudo dos interferentes

Foi feito um estudo para avaliar a interferência química de alguns compostos na reacção de quimiluminescência. Os compostos estudados foram os que habitualmente se encontram presentes nas formulações farmacêuticas analisadas, nomeadamente arginina (Fluka[®]), cetrimida (Farmácia Neves), cloreto de sódio (Riedel-de-Haën), dihidrogenofosfato de potássio (Riedel-de-Haën), EDTA (Fluka[®]), fosfato monossódico (Merck), fosfato dissódico (Merck), glicerol (Sigma-Aldrich[®]), hidroxipropil- β -ciclodextrina (Fluka[®]), PVP (Merck), indometacina (Sigma-Aldrich[®]), dexametasona (Fluka[®]), tetrizolina (Sigma-Aldrich[®]), metilparabeno, propilparabeno, timerosal, cloreto de benzalcónio e bissulfito de sódio (estes últimos gentilmente cedidos pelo Serviço de Tecnologia Farmacêutica da FFUP).

Todas as soluções de interferentes foram preparadas com água recentemente fervida, com a excepção da solução “stock” de indometacina que foi preparada com uma solução de hidroxipropil- β -ciclodextrina 0,01 mol l⁻¹. Para tal dissolveu-se 1,38 g de hidroxipropil- β -ciclodextrina (Fluka[®]) em 100 ml de água e homogeneizou-se a solução obtida. Em seguida utilizou-se esta solução de hidroxipropil- β -ciclodextrina para preparar a solução “stock” de indometacina.

Para a indometacina optou-se por um método de preparação diferente, porque este composto é praticamente insolúvel em água [91], e como a formulação farmacêutica (colírio) em que ele está presente contem hidroxipropil- β -ciclodextrina, deduziu-se que a sua função na formulação seria de aumentar a solubilidade da indometacina, decidindo-se então realizar a dissolução deste fármaco numa solução deste composto, tendo-se testado para o efeito diferentes concentrações de hidroxipropil- β -ciclodextrina, sendo a de 0,01 mol l⁻¹, aquela que apresentou uma melhor solubilidade da indometacina.

2.2- Instrumentação e equipamentos

Para a purificação da água usada em todos os ensaios utilizou-se um sistema de filtração da marca Millipore, adaptado a um sistema de ultra-purificação de água, da marca Milli Q.

Sempre que foi necessário realizar pesagens rigorosas de reagentes sólidos recorreu-se a uma balança analítica da marca Mettler Toledo, modelo AG285, com sensibilidade de 0,00001 g.

Todas as soluções foram preparadas em material de vidro de classe A, previamente lavado, e na medição de volumes rigorosos e inferiores a 5000 µl utilizaram-se pipetas de volumes reguláveis (Labmate 100, Labmate 1000 e Labmate 5000), com pontas de plástico descartáveis.

Sempre que foi necessário ajustar o pH das soluções preparadas e para o controlo do mesmo recorreu-se a um milivoltímetro da marca Crison, modelo GLP 22 equipado com um eléctrodo de vidro combinado de AgCl/Ag, modelo 52-02, e solução de KCl 3 mol l⁻¹ saturada com AgCl.

Na análise das pomadas oftálmicas o aquecimento das soluções foi efectuado recorrendo a uma placa de aquecimento da marca Falc Instruments, modelo F 60.

As determinações espectrofotométricas realizadas para controlar a concentração da solução comercial de hipoclorito de sódio foram realizadas com um espectrofotómetro de UV/VIS, de feixe duplo, da marca Perkin Elmer, modelo Lambda 45, operando a 235 nm.

A metodologia analítica proposta para a análise da gentamicina baseou-se na implementação de um sistema de multicomutação, englobando os componentes básicos dos sistemas analíticos de fluxo, ou seja, um dispositivo de propulsão, dispositivos de inserção da amostra e reagentes, um dispositivo de detecção e um sistema de controlo.

O sistema de propulsão utilizado foi uma bomba peristáltica da marca Gilson, modelo Minipuls 3 (Figura 2.1), equipada com uma cabeça de quatro canais com dez cilindros de aço inoxidável, capaz de produzir diferentes caudais de um modo reprodutível, devido à conjugação da velocidade da bomba peristáltica com o diâmetro interno dos tubos de propulsão. Neste trabalho, utilizaram-se três tubos de propulsão em

policloreto de vinilo (PVC) marca Tygon[®], sendo um tubo preto/preto (diâmetro interno de 0,76 mm) e dois tubos cinzento/cinzento (diâmetro interno 1,30 mm).

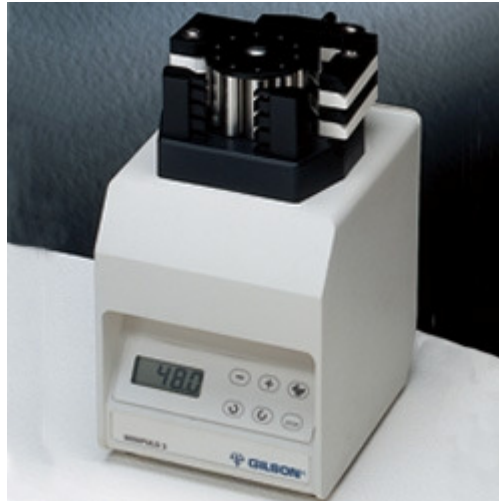


Figura 2.1 – Bomba peristáltica Gilson Minipuls 3 [92].

Como dispositivos de inserção da amostra e reagentes utilizaram-se três válvulas solenóides. A inserção da amostra e reagentes era efectuada por comutação das válvulas entre a posição ligada e desligada, permitindo a introdução das soluções durante um intervalo de tempo pré-definido, estabelecendo-se assim um volume de amostragem em função do caudal utilizado.

As válvulas solenóides (válvulas com activação electromecânica por solenóide) eram da marca NResearch Inc., e utilizaram-se três válvulas de três vias (uma entrada/duas saídas) modelo 161 T031 (Figura 2.2). Estas válvulas apresentam um reduzido volume interno (cerca de 27 μ l), a pressão máxima de funcionamento é de 30 psi, têm um curto tempo de resposta, permitindo frequências de comutação de 10 Hz, são revestidas por teflon (PTFE), o que lhes confere uma elevada resistência química, a fonte de alimentação é de 12 V e são dispositivos de baixo custo.



Figura 2.2 – Válvula solenóide de três vias da NResearch Inc. [93].

Para ligar os diferentes componentes do sistema de fluxo utilizou-se tubagem de teflon (PTFE) da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8 mm. O reactor de mistura também foi construído com esta mesma tubagem, apresentando uma forma helicoidal e um comprimento de 50 cm. O sistema de multicomutação também tinha uma confluência em forma de “Y” fabricada em perspex.

O dispositivo de detecção incorporado no sistema de fluxo multicomutado era um luminómetro da marca Camspec, modelo CL-2, equipado com uma célula de fluxo com um volume de 60 μl e um percurso óptico de 5 mm. A detecção da radiação emitida era efectuada por um fotomultiplicador, o qual apresentava uma zona de resposta para comprimentos de onda no intervalo de 320 a 600 nm.

A célula de fluxo (Figura 2.3) tinha duas portas de entrada e uma de saída e apresentava uma configuração que favorecia a mistura de reagentes no seu interior. A configuração da célula de fluxo permitia a inserção da amostra misturada com o oxidante (ponto Z) e reagente (espécie emissora de luminescência: luminol) através das duas portas de entrada. Esta configuração favorecia a mistura das soluções no ponto X (confluência existente no interior do luminómetro), mesmo à entrada da célula de fluxo que, por sua vez, estava alinhada com o fotomultiplicador o que permitia a detecção do máximo de radiação emitida.

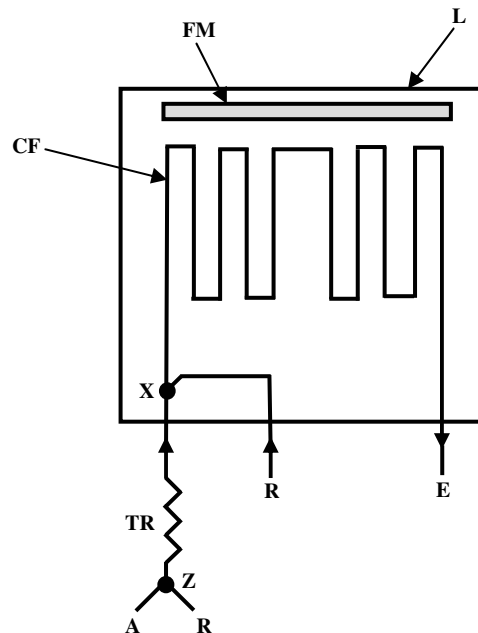


Figura 2.3 – Representação esquemática do luminómetro mostrando os pontos de mistura das soluções. L – Luminómetro; FM – Fotomultiplicador; CF – Célula de fluxo;

TR – Tubo reactor; X e Z – Pontos de confluência; A – Amostra; R – Reagentes; E – Esgoto.

Os sinais analíticos fornecidos pelo detector eram adquiridos por via informática, através de um programa elaborado para o efeito.

Como sistema de controlo do equipamento, aquisição e processamento de dados foi utilizado um microcomputador Pentium. A comunicação entre o computador e os componentes do sistema de fluxo multicomutado, nomeadamente as válvulas solenóides, era efectuado através de interfaces da marca Advantech[®], modelo PC-LABCard PCL-711B.

O software utilizado para o controlo, aquisição e tratamento de dados foi escrito com recurso a uma linguagem de alto nível, BASIC, implementada em ambiente DOS (QuickBasic 4.5), tendo em conta os objectivos do trabalho, funcionalidade e versatilidade. Genericamente, o programa informático permitia definir a sequência de etapas de cada ciclo e o número de determinações realizado para cada solução padrão ou amostra. As instruções inseridas no computador eram relativas ao tempo de inserção de uma alíquota de amostra e de uma alíquota de cada um dos reagentes, ao tempo de leitura do sinal analítico, ao número de ciclos de amostragem e ao número de determinações realizadas para cada amostra. Mais adiante descrever-se-à em pormenor o ciclo analítico programado.

2.3- Procedimento em fluxo

O sistema de fluxo multicomutado desenvolvido para a determinação de gentamicina em formulações farmacêuticas (Figura 2.4) era constituído por uma bomba peristáltica, a operar no modo de propulsão, três válvulas solenóides de três vias, uma confluência em perspex em forma de “Y” para ligação entre os canais da amostra e do hipoclorito de sódio, um tubo reactor e um detector de quimiluminescência, interligados com tubos de teflon.

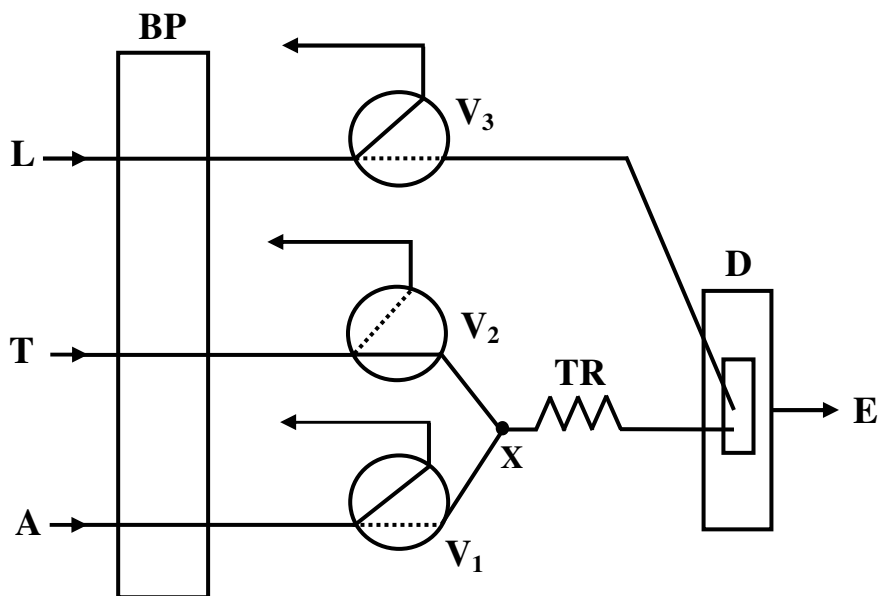


Figura 2.4 – Esquema da montagem de fluxo multicomutado utilizada na determinação de gentamicina em formulações farmacêuticas. A – Amostra; T – Solução transportadora (solução de hipoclorito de sódio); L – Solução de luminol; BP – Bomba peristáltica; V₁, V₂ e V₃ – Válvulas solenóides de três vias (as linhas contínuas no interior das válvulas correspondem à posição 1 e as linhas a tracejado correspondem à posição 2); X – Ponto de confluência; TR – Tubo reactor de 50 cm; D – Detector de quimiluminescência; E – Esgoto.

Na montagem de fluxo (Figura 2.4) estabelecida V₁ era responsável pela inserção da amostra, V₂ era responsável pela inserção da solução de hipoclorito de sódio, que também funcionava como transportador, e V₃ era responsável pela inserção da solução de luminol, directamente no detector.

Antes do início do ciclo analítico enchia-se a tubagem ligada a cada válvula solenóide com a respectiva solução. Nesta altura, somente a válvula V_2 estava na posição 1, sendo a solução de hipoclorito de sódio propulsionada para o detector. No que concerne à amostra e solução de luminol, como as válvulas V_1 e V_3 estavam na posição 2, estas soluções sofriam recirculação retornando aos recipientes iniciais onde estavam contidas (Figura 2.5).

Cada ciclo analítico correspondente à amostragem binária iniciava-se com as válvulas V_1 e V_2 a alternarem entre a posição 1 e a posição 2, durante um tempo pré-definido, para introduzir pequenas alíquotas de amostra intercaladas com pequenas alíquotas de hipoclorito de sódio. Desta forma criavam-se várias interfaces de reacção e promovia-se mais facilmente a mistura entre a amostra e reagente. O tempo total de amostragem era definido pelo número e tempo de cada ciclo de intercalação e, juntamente com o caudal, era possível estabelecer-se o volume total de amostragem.

Após a inserção da amostra, V_1 passava para a posição 2 e V_2 permanecia na posição 1 de modo a transportar a mistura amostra/solução de hipoclorito de sódio para o detector, e V_3 era activada para a posição 1 propulsionando a solução de luminol directamente para o detector durante um tempo pré-definido. Dentro do detector, a mistura amostra/hipoclorito de sódio reagia com a solução de luminol no interior da célula de fluxo, havendo um rápido desenvolvimento da reacção de quimiluminescência. A aquisição do sinal analítico pelo computador iniciava-se com a introdução da alíquota de solução de luminol e continuava após a válvula V_3 passar para a posição 2 durante um tempo pré-definido. Concluída a detecção da amostra, V_2 permanecia na posição 1 para lavagem do sistema.

Na Tabela 2.1 é apresentado o protocolo de operações do sistema de fluxo para a determinação de gentamicina em formulações farmacêuticas.

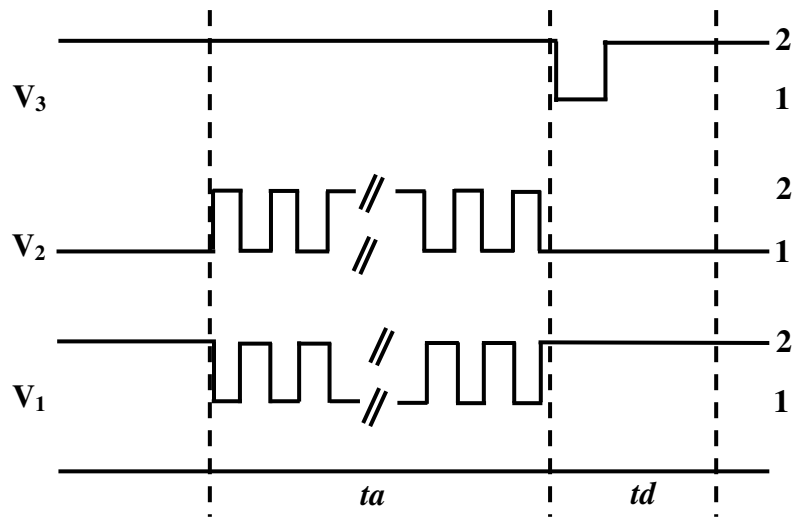


Figura 2.5 – Representação esquemática da posição das válvulas solenóides durante o ciclo analítico. V_1 a V_3 – Válvulas solenóides; 1 e 2 – Posição das válvulas; t_a – Tempo de amostragem; t_d – Tempo de inserção do luminol, reacção deste com a mistura amostra/hipoclorito de sódio e detecção.

Tabela 2.1 – Protocolo de operações do sistema de fluxo para a determinação de gentamicina em formulações farmacêuticas.

Etapas	Tempo (s)
Tempo de inserção amostra	1,5
Tempo de inserção hipoclorito de sódio	1,5
Tempo de inserção luminol e leitura do sinal	2,5
Aquisição de dados	20
Número de réplicas = 3	
Número de ciclos de amostragem = 12	

2.4 – Optimização da montagem de fluxo e validação do método analítico desenvolvido

Durante o desenvolvimento do sistema analítico proposto foram realizados diversos estudos com o intuito de otimizar quer os parâmetros físicos quer os parâmetros químicos, tendo como critério a maximização do sinal analítico obtido em cada determinação.

A selecção do valor mais adequado para cada um dos parâmetros que influenciam o desempenho do sistema analítico foi efectuada com base no método da análise univariada, ou seja, fazendo-se variar apenas um parâmetro, enquanto se mantinham constantes os valores dos restantes. Tal como foi referido, a maximização do sinal analítico foi o critério de optimização utilizado, no entanto em certas situações teve que se estabelecer um compromisso entre diferentes factores, tais como o limite de detecção, a sensibilidade, o ritmo de amostragem e o consumo de reagentes, que caracterizavam o desempenho do sistema analítico, de modo a maximizar a eficiência analítica.

Com o intuito de provar a utilidade do método analítico proposto para a determinação de sulfato de gentamicina em formulações farmacêuticas procedeu-se à avaliação das suas características analíticas, nomeadamente à determinação de alguns parâmetros como por exemplo a linearidade, exactidão, precisão, limite de detecção e robustez.

A determinação da gentamicina nas diferentes formulações farmacêuticas foi realizada através do traçado de curvas de calibração, recorrendo-se para o efeito a soluções de concentração crescente da espécie a determinar, de modo a se estabelecer o intervalo de concentrações em que se verificava uma relação linear entre a espécie a determinar e a medida do sinal analítico obtido. O traçado da curva de calibração foi realizado utilizando o valor médio de um conjunto de intensidades do sinal analítico, expressas em milivoltes (mV), em função da concentração de soluções padrão de sulfato de gentamicina, com concentrações crescentes. A concentração final do analito presente na amostra era obtida por interpolação gráfica. Para cada concentração de solução padrão e amostra eram realizadas três determinações consecutivas.

O limite de detecção de uma operação analítica, expresso em concentração (C_L), é determinado com base na menor medição da espécie a analisar (x_L) para a qual se

consegue obter uma resposta analítica com uma certeza razoável. Seguindo as directrizes da IUPAC [94], o limite de detecção foi calculado utilizando-se a seguinte expressão: $x_L = x_{b1} + ks_{b1}$, em que x_{b1} é o valor médio do sinal obtido para 10 determinações consecutivas do branco, s_{b1} é o desvio padrão associado às determinações do branco e k é um factor numérico escolhido de acordo com o grau de confiança pretendido. Normalmente, usa-se o valor 3 que corresponde, na prática, a um grau de confiança de cerca de 90%. Por fim, aplicando-se a expressão: $C_L = (x_L - x_{b1})/S$, em que S corresponde à sensibilidade do método, sendo definido como o declive da curva de calibração, obteve-se o limite de detecção.

A precisão da metodologia foi avaliada calculando a repetibilidade dos sinais analíticos obtidos pelo ensaio de uma ou mais amostras durante um dia de trabalho.

O ritmo de amostragem, expresso em número de determinações por hora, foi estimado tendo em conta o tempo necessário para a realização de um ciclo analítico.

Nas diferentes monografias oficiais, a metodologia descrita para a análise de gentamicina em formulações farmacêuticas baseia-se em ensaios microbiológicos [49]. Neste caso, porque não foram efectuados os referidos ensaios, a exactidão da metodologia desenvolvida foi avaliada através de ensaios de recuperação. Estes foram realizados através da adição de quantidades conhecidas de solução padrão da espécie a determinar a cada amostra. A percentagem de recuperação foi calculada através da expressão $(C_{a+p} - C_a) \times 100/C_p$, em que C_{a+p} corresponde à concentração encontrada para a amostra adicionada de padrão, C_a é a concentração encontrada para a amostra e C_p é a concentração de solução padrão adicionada à amostra [95].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Introdução

Tal como se referiu anteriormente, a metodologia desenvolvida baseia-se no efeito inibidor da gentamicina na reacção de quimiluminescência entre o luminol e o hipoclorito, causando uma diminuição da intensidade de radiação emitida. Deste modo, a inibição da intensidade do sinal analítico será proporcional à concentração de gentamicina. Porque a emissão de radiação é afectada por vários parâmetros químicos e instrumentais, e conseqüentemente os resultados obtidos, procedeu-se à optimização do sistema de fluxo de forma a garantir o efeito inibidor máximo.

3.1.1 – Optimização dos parâmetros físico-químicos

Um dos parâmetros do sistema analítico que mais afecta o efeito inibidor da intensidade do sinal analítico é a ordem pela qual os reagentes são adicionados. Isto deve-se ao facto do efeito inibidor na radiação emitida estar relacionado com o consumo de hipoclorito de sódio pela gentamicina, estando o seu excesso disponível para reagir com o luminol. Terá por isso que ocorrer inicialmente a mistura da solução de hipoclorito com a amostra, pelo que estas duas soluções deverão ser inseridas em simultâneo no sistema de fluxo, e só posteriormente a solução resultante desta mistura irá reagir com a solução de luminol. Desta última resulta o desenvolvimento da reacção de quimiluminescência e, conseqüentemente, a inibição do sinal analítico. A oxidação do luminol pelo hipoclorito para originar o composto emissor da radiação (3-aminofalato) é uma reacção muito rápida (na ordem dos milisegundos), ocorrendo desta forma no interior da célula de fluxo, o que permite a detecção do máximo de radiação emitida.

A estratégia de amostragem binária utilizada na montagem de fluxo desenvolvida que correspondia à intercalação de pequenas alíquotas de amostra com pequenas alíquotas de solução de hipoclorito, resultou numa sequência contínua de interfaces entre as duas soluções, favorecendo a obtenção de um elevado grau de homogeneização e facilitando o desenvolvimento da reacção. Este elevado grau de homogeneização das duas soluções é fundamental para a eficiência da reacção entre estas e a solução de luminol.

Outro parâmetro importante na obtenção de um efeito inibidor elevado é o tempo de reacção entre o hipoclorito e a gentamicina. No sentido de aumentar o tempo de reacção recorreu-se à incorporação de um reactor entre o ponto de confluência X e o luminómetro (ver Figura 2.4), local onde a mistura amostra/hipoclorito se vai encontrar com a solução de luminol. Por isso avaliou-se a influência da utilização ou não de um reactor e do seu comprimento na intensidade de radiação emitida e o seu efeito no grau de inibição produzido. Testaram-se três comprimentos de reactor diferentes com 12,8; 50 e 100 cm. Verificou-se que era importante a presença de um tubo reactor na reacção de inibição e que a intensidade do sinal analítico emitido era máxima para um valor de comprimento igual a 50 cm, estabilizando depois quando se aumentava para o dobro esse comprimento. Deste modo utilizou-se um tubo reactor de 50 cm pois permitia obter um tempo de reacção menor, sem comprometer em demasia o valor da intensidade do sinal analítico, favorecendo o ritmo de amostragem. Apesar de se utilizar a amostragem binária para promover a mistura da amostra com o hipoclorito, a reacção de oxidação demora um certo tempo pelo que é necessário usar-se um reactor. Desta forma a inibição da amplitude do sinal analítico é reforçada.

O estudo da influência do volume de amostra inserido na altura do sinal analítico detectado foi avaliado para valores que variavam entre os 323 e os 1075 μl , o que corresponde a um tempo total de inserção de amostra entre 9 e 30 segundos, divididos por tempos de intercalação de 1,5 segundos. Este ensaio foi realizado com água e uma solução de gentamicina de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$. O perfil de variação da inibição do sinal analítico em função do número de ciclos de intercalação é representado na Figura 3.1. Verificou-se que entre os 6 e os 12 ciclos de intercalação havia uma ligeira diminuição da amplitude do sinal analítico, provavelmente devido a uma ineficaz mistura da amostra e da solução de hipoclorito uma vez que o número de interfaces que se estabelece entre estas duas soluções é mais baixo. A partir dos 12 ciclos o valor da intensidade do sinal analítico mantinha-se praticamente constante, o que faz supor que a mistura obtida para estas duas soluções era homogénea.

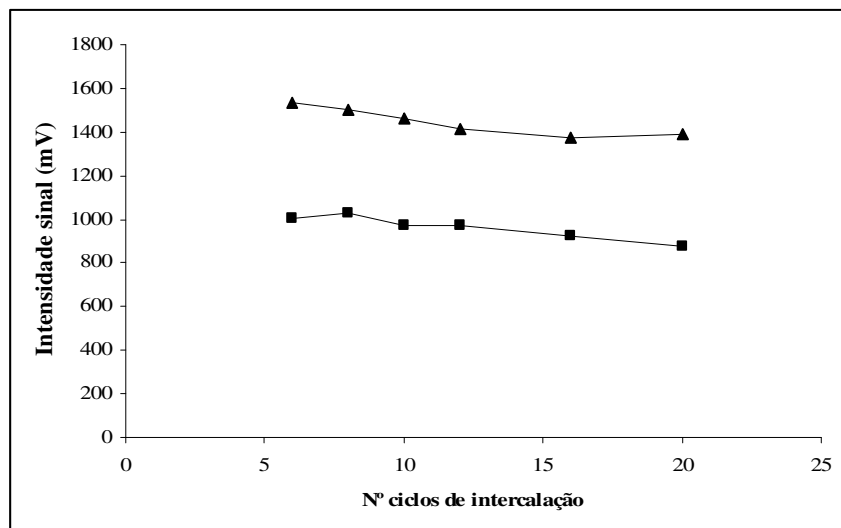


Figura 3.1 – Influência do número de ciclos de intercalação de amostra e solução de hipoclorito no sinal analítico. Os resultados referem-se à análise do branco (▲) e de uma solução de padrão de gentamicina com concentração de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (■).

Outro parâmetro crítico para uma metodologia quimiluminométrica de fluxo é a influência do valor do caudal na resposta do detector, pois é ele que determina o tempo de permanência das soluções no interior da célula de fluxo, influenciando assim a intensidade da radiação emitida. A variação do caudal pode condicionar a detecção do sinal analítico de acordo com a cinética da reacção produzida. Assim, para valores de caudal muito lentos ou muito elevados, o desenvolvimento da reacção pode ocorrer antes ou depois da célula de fluxo, respectivamente. Uma vez que se utilizou uma bomba peristáltica como dispositivo propulsor, o caudal das soluções vai depender da velocidade da bomba peristáltica. Para o estudo da sua influência testaram-se caudais de $2,85$; $2,15$ e $1,8 \text{ ml min}^{-1}$ para a amostra e solução de hipoclorito conjuntamente com caudais de $1,5$; $1,0$ e $0,85 \text{ ml min}^{-1}$ para a solução de luminol, respectivamente. Constatou-se que se obtinha uma maior amplitude do sinal analítico com caudais de $2,15 \text{ ml min}^{-1}$ para a amostra e solução de hipoclorito conjuntamente com um caudal de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ para a solução de luminol (Figura 3.2).

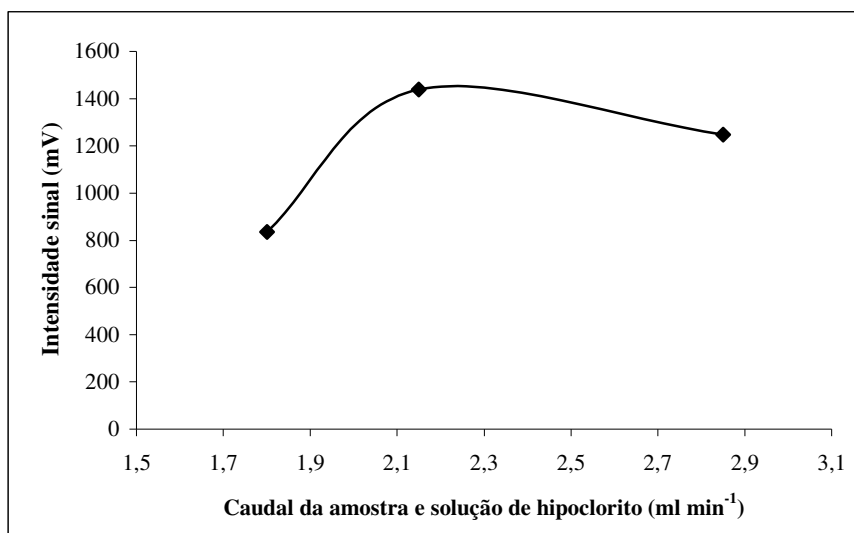


Figura 3.2 – Influência do caudal no sinal analítico referente ao branco. Os resultados apresentados estão em função do caudal da amostra e solução de hipoclorito.

Após se ter realizado o estudo e otimização dos parâmetros de fluxo, procedeu-se ao estudo dos parâmetros químicos no sistema de multicomutação. Relativamente a estes últimos estudaram-se as concentrações do hipoclorito e do luminol, bem como a influência do pH destas duas soluções na reacção de quimiluminescência, pois estes dois reagentes têm uma grande influência na intensidade da radiação emitida.

A influência da concentração da solução de hipoclorito de sódio na amplitude do sinal analítico foi avaliada para um intervalo de concentrações entre $5,0 \times 10^{-6}$ e $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, recorrendo a um padrão de gentamicina de concentração $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 3.3). O efeito inibidor foi mais pronunciado para a concentração de $1,7 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ e também se verificou que, para a concentração de $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ocorria a saturação do detector, pelo que não era possível avaliar a amplitude do sinal analítico obtido.

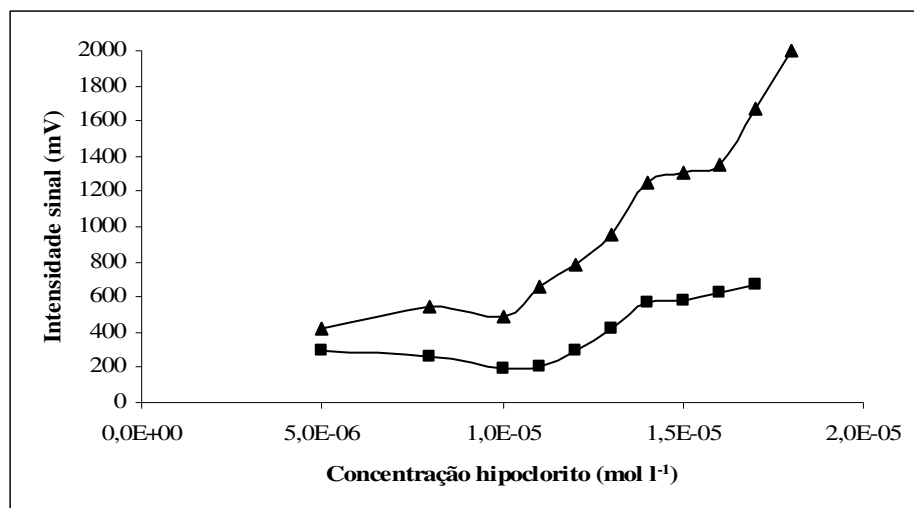


Figura 3.3 – Influência da concentração da solução de hipoclorito de sódio no sinal analítico. Os resultados referem-se à análise do branco (▲) e de um padrão de gentamicina de concentração 1 µg ml⁻¹ (■).

Após se fixar a concentração do hipoclorito de sódio, realizou-se o estudo da influência do pH desta solução no desenvolvimento da reação de quimiluminescência. Para tal inseriram-se na montagem de fluxo várias soluções de hipoclorito com uma concentração de $1,7 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, preparadas em tampão carbonato com valores de pH entre 9 e 11 unidades. Neste estudo utilizou-se água ou uma solução padrão de gentamicina de concentração 1 µg ml⁻¹ como amostra. Como se pode observar na Figura 3.4, embora a intensidade de radiação emitida fosse maior a pH 10 verificou-se que o efeito inibidor era mais pronunciado para valores de pH de 9,5, tendo por isso sido este escolhido para os estudos posteriores.

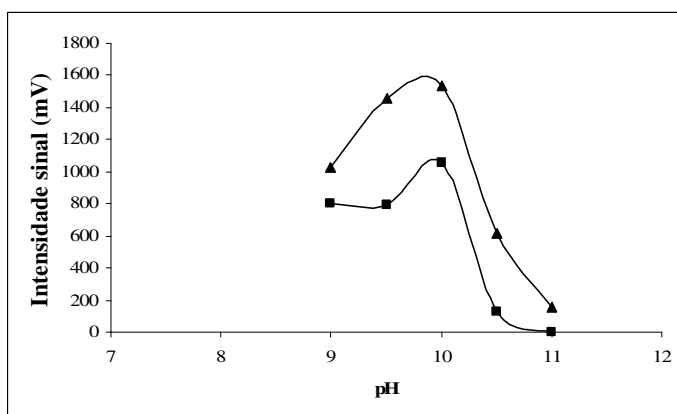


Figura 3.4 – Influência do pH da solução de hipoclorito de sódio no sinal analítico. Os resultados referem-se à análise do branco (▲) e de um padrão de gentamicina de concentração 1 µg ml⁻¹ (■).

O efeito da concentração da solução de luminol foi avaliado para um intervalo de concentrações entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, utilizando um padrão de gentamicina de concentração $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 3.5). O efeito inibidor era mais pronunciado quando a concentração de luminol era de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Para valores de concentração de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ocorria a saturação do detector, sendo impossível avaliar a variação da radiação emitida.

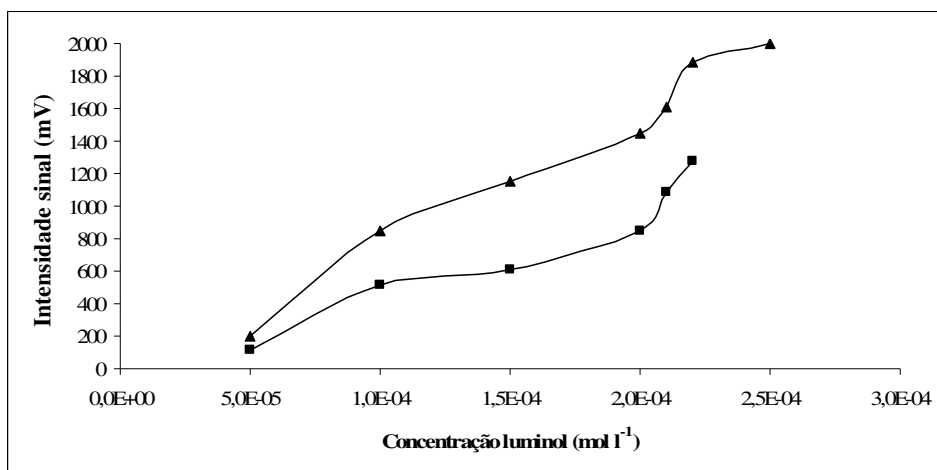


Figura 3.5 – Influência da concentração da solução de luminol no sinal analítico. Os resultados referem-se à análise do branco (▲) e de um padrão de gentamicina de concentração $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (■).

Também neste caso foi avaliada a influência do pH da solução de luminol no desenvolvimento da reacção de quimiluminescência. Utilizaram-se várias soluções de luminol com uma concentração de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, preparadas em soluções de carbonato de sódio $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ com valores de pH entre 8 e 12,6 unidades. Para valores de pH superiores a 9,5 unidades ocorria a saturação do detector não sendo por isso possível registar qualquer variação da radiação emitida (Figura 3.6). Assim, para a realização de estudos posteriores, optou-se pela utilização de uma solução de luminol com pH 9,2 correspondendo a um compromisso entre o aumento de intensidade de radiação sem que ocorresse a saturação do detector.

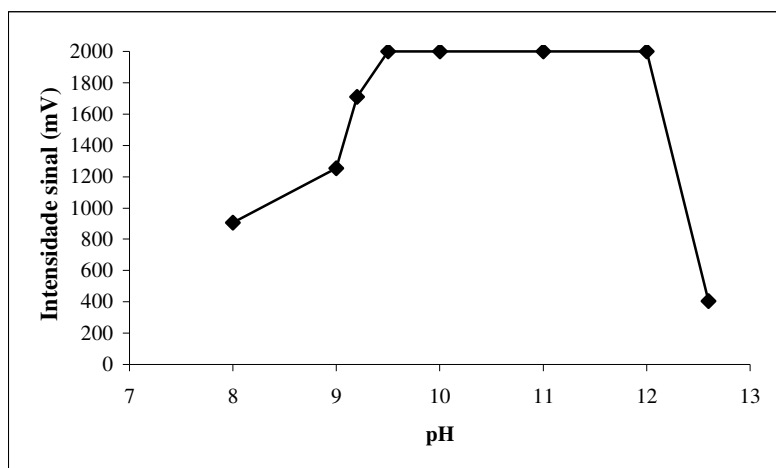


Figura 3.6 – Influência do pH da solução de luminol no sinal analítico. O valor de 2000 mV corresponde à saturação do detector.

Na Tabela 3.1 sintetizam-se as condições experimentais resultantes das optimizações efectuadas tanto para os parâmetros de fluxo como para os químicos na montagem estabelecida para a determinação de gentamicina em formulações farmacêuticas.

Tabela 3.1 – Valores optimizados dos parâmetros analíticos.

Parâmetros analíticos	
Concentração de luminol	$2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$
Concentração de hipoclorito de sódio	$1,7 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$
pH (luminol)	9,2 unidades
pH (hipoclorito de sódio)	9,5 unidades
Volume de amostra	645 μl
Volume de luminol	41,7 μl
Caudal de inserção da amostra e hipoclorito de sódio	2,15 ml min^{-1}
Caudal de inserção do luminol	1,0 ml min^{-1}

Concluída a optimização e utilizando as condições experimentais definidas anteriormente (Tabela 3.1) traçou-se a curva de calibração, obtendo-se uma zona de resposta linear entre 0,2 e 2,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de sulfato de gentamicina. A curva de calibração obtida é representada pela equação $I_{em} = -402,53(\pm 1,47)C + 1539,8(\pm 1,2)$, onde I_{em} corresponde à intensidade da radiação emitida, expressa em mV, e C à concentração de

sulfato de gentamicina expressa em $\mu\text{g ml}^{-1}$, com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9981 ($n = 3$). Na Figura 3.7 apresenta-se o registo gráfico correspondente ao traçado de uma curva de calibração de padrões de gentamicina com diferentes concentrações.

O limite de detecção calculado de acordo com o referido na secção 2.4 era igual a $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$. Com as condições estabelecidas foi possível obter um ritmo de amostragem de cerca de 62 determinações por hora.

A precisão do método proposto foi avaliada relativamente à repetibilidade, constatando-se que a metodologia apresentava valores de desvio padrão relativo (RSD), expressos em percentagem, entre 0,2 e 2,1%. Também se avaliou a precisão intermédia do método, observando-se que o desvio padrão relativo não era superior a 3,4%.

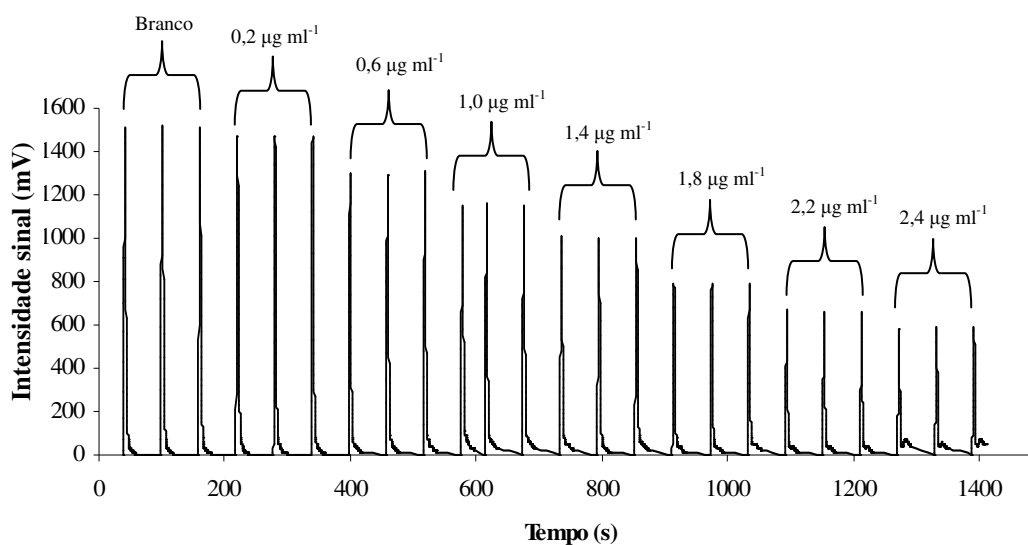


Figura 3.7 – Registo gráfico obtido na elaboração da curva de calibração.

3.1.2 – Avaliação dos interferentes

No sentido de avaliar a utilidade analítica do método proposto na análise de amostras reais efectuou-se o estudo da interferência de alguns compostos habitualmente usados como adjuvantes de formulação ou substâncias activas em associação, presentes em medicamentos comercializados contendo gentamicina. Este estudo foi realizado através da análise de soluções contendo diferentes concentrações de interferente, mantendo contudo a concentração de sulfato de gentamicina fixada a $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.

Os estudos incidiram sobre amostras contendo proporções relativas de interferente:gentamicina de 100:1, 50:1, 25:1, 10:1 e 1:1. Um composto era considerado interferente sempre que a sua presença provocasse uma variação do sinal analítico superior a 3%, comparativamente com o valor do sinal analítico obtido na sua ausência. Considerou-se uma variação de 3%, pois pretendia-se que todos os resultados relativos à gentamicina estivessem dentro de um intervalo de confiança de 97%. Encontram-se representados na Tabela 3.2 os resultados obtidos nesta avaliação.

Tabela 3.2 – Síntese dos resultados obtidos na avaliação dos interferentes.

Interferente	Proporção relativa interferente:gentamicina				
	100:1	50:1	25:1	10:1	1:1
Arginina	> 3%	> 3%	> 3%	> 3%	> 3%
Bissulfito de sódio	> 3%	> 3%	> 3%	> 3%	> 3%
Cetrimida	> 3%	Não interfere	—	—	—
Cloreto de benzalcónio	> 3%	Não interfere	—	—	—
Cloreto de sódio	Não interfere	—	—	—	—
Dihidrogenofosfato de potássio	Não interfere	—	—	—	—
EDTA	> 3%	Não interfere	—	—	—
Fosfato monossódico	Não interfere	—	—	—	—
Fosfato dissódico	Não interfere	—	—	—	—
Glicerol	Não interfere	—	—	—	—
Metilparabeno	Não interfere	—	—	—	—
Propilparabeno	Não interfere	—	—	—	—
Hidroxipropil- β -ciclodextrina	Não interfere	—	—	—	—
Mercuritiolato de sódio	> 3%	> 3%	> 3%	> 3%	> 3%
PVP	> 3%	> 3%	> 3%	> 3%	Não interfere
Dexametasona	Não interfere	—	—	—	—
Tetrazolina	> 3%	> 3%	> 3%	> 3%	Não interfere
Indometacina	> 3%	> 3%	Não interfere	—	—

Com base nos resultados obtidos constata-se que, compostos como a arginina, o bissulfito de sódio e o mercuritiolato de sódio interferem nos sinais analíticos. Nalguns casos estão presentes nas formulações em concentrações muito mais baixas do que a gentamicina. É o caso do mercuritiolato de sódio cujas concentrações nos colírios são

50 000 a 100 000 vezes mais baixas do que a da substância activa [96], logo a probabilidade de serem interferentes na reacção de quimiluminescência é mínima. No que concerne ao bissulfito de sódio, este composto é usado como agente antioxidante em medicamentos injectáveis cuja substância activa é passível de sofrer oxidação. Normalmente, o bissulfito de sódio é empregue numa concentração de 0,5% [96], à qual corresponde uma proporção relativa de interferente:gentamicina de 1:1 facto que justifica a elevada interferência sem pré-tratamento das amostras reais antes de proceder à sua análise.

A dexametasona, a tetrizolina e a indometacina são compostos veiculados em associação com a gentamicina em diferentes colírios. No entanto, estas substâncias activas encontram-se sempre numa concentração inferior à da gentamicina, pelo que a probabilidade de interferirem no sinal analítico é mínima, não sendo por isso valorizáveis os resultados de interferência expressos na Tabela 3.2, especialmente para a tetrizolina. Também o PVP, utilizado como viscosificante de soluções aquosas de modo a garantir que a substância activa se mantém mais tempo em contacto com a córnea [96], está sempre em concentrações inferiores à da gentamicina pelo que pode ser considerado não interferente, de acordo com os resultados da Tabela 3.2.

3.1.3 – Análise de formulações farmacêuticas

Para avaliar o desempenho analítico da metodologia desenvolvida utilizou-se o sistema de fluxo multicomutado proposto na análise de diferentes formulações farmacêuticas que se encontravam disponíveis no mercado português.

A preparação das amostras variou consoante a fórmula farmacêutica considerada (colírio, solução injectável ou pomada oftálmica), tal como foi referido na secção 2.1.1 desta dissertação, procedendo-se depois à sua análise.

Na impossibilidade de se realizar um método de referência para confirmar os resultados obtidos com a metodologia proposta, devido a este não estar descrito para o produto acabado, realizaram-se ensaios de recuperação tendo em conta que destes se poderá depreender apenas que o procedimento proposto também origina resultados exactos para a espécie química em análise.

Para a realização dos ensaios de recuperação adicionou-se $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ de solução padrão de sulfato de gentamicina às amostras dos colírios e $0,6 \mu\text{g ml}^{-1}$ de solução padrão de sulfato de gentamicina às amostras das soluções injectáveis e das pomadas oftálmicas.

Na Tabela 3.3 encontram-se resumidos os resultados obtidos para a análise e ensaios de recuperação das diferentes amostras de colírios.

Tabela 3.3 – Resultados da análise de colírios contendo gentamicina e dos ensaios de recuperação.

Amostra	Concentração declarada (mg/ml de formulação)	Concentração encontrada (mg/ml de formulação)*	Recuperação (%)
Gentocil [®]	4,42	$4,79 \pm 0,02$	100
Ophtagram [®]	3,0	$4,96 \pm 0,06$	99
Indobiotic [®]	5,08	$5,98 \pm 0,07$	101
Dexamytrex [®] Ophtiole	5,0	$5,72 \pm 0,06$	80
[®] Colircusí Gentadexa	4,42	$4,85 \pm 0,04$	116

*Determinações correspondentes à média de 6 ensaios realizados com duas amostras preparadas do mesmo lote.

Embora para a maioria das amostras se tenham obtido valores de recuperação aceitáveis, no caso do Dexamytrex[®] Ophtiole e do [®]Colircusí Gentadexa os valores apresentados não permitem uma análise conclusiva dos dados. Devido ao período limitado que é estabelecido para a realização desta tese conjuntamente com problemas técnicos que entretanto foram identificados no detector não foi possível realizar a sua repetição. Este aspecto será objecto de verificação após a apresentação desta dissertação e após verificação técnica do detector.

Pela análise da Tabela 3.3 constata-se que, para todas as amostras, as concentrações de gentamicina encontradas nos diferentes colírios são superiores às concentrações declaradas, o que pressupõe um desvio positivo sistemático. Contudo, esses valores não corroboram com os valores de recuperação obtidos e que aferem da exactidão para esta metodologia.

Normalmente, para a maioria dos medicamentos o valor de substância activa presente na formulação é superior àquele que é declarado pela indústria farmacêutica, de modo a se poderem compensar eventuais perdas por degradação ao longo do tempo de armazenamento. Para colírios contendo gentamicina, a Farmacopeia Americana [49] considera-os aceitáveis se contiverem entre 90 a 135% da concentração de substância activa declarada. Sendo assim, de todos os colírios analisados apenas o Ophtagram[®] apresenta uma concentração que se encontra fora do intervalo estipulado pela monografia oficial.

Também se estendeu a aplicação do método a outras formulações farmacêuticas, nomeadamente soluções injectáveis e pomadas oftálmicas. Nas Tabelas 3.4 e 3.5 apresentam-se os resultados obtidos.

Tabela 3.4 – Resultados da análise de soluções injectáveis contendo gentamicina e dos ensaios de recuperação.

Amostra	Concentração declarada (mg/ml de formulação)	Concentração encontrada (mg/ml de formulação)*		Recuperação (%)
		Amostra sem tratamento	Amostra com tratamento	
Gentamicina Labesfal	40	64,46 ± 2,63	46,67 ± 0,25	141
Garalone [®]	80	122,98 ± 0,88	98,41 ± 0,27	102

*Determinações correspondentes à média de 6 ensaios realizados com duas amostras preparadas do mesmo lote.

No caso das soluções injectáveis, a presença do bissulfito de sódio, como foi referido anteriormente, constitui uma forte fonte de interferência da reacção de oxidação do hipoclorito com a gentamicina. Na Tabela 3.4 os resultados indiciam que o tratamento das amostras contribui para uma melhoria dos valores obtidos para a

concentração do produto analisado. Este aspecto merece igualmente um estudo mais sistematizado em que deverão ser optimizadas as condições de tratamento das amostras. Em particular, deverá proceder-se a tratamentos em que se varie o volume de ácido clorídrico concentrado, utilizado para converter o bissulfito de sódio em dióxido de enxofre, que é posteriormente removido com o auxílio da corrente de azoto [90], bem como o tempo durante o qual se borbulhava azoto na solução.

Também é de referir que neste caso os ensaios de recuperação foram realizados por adição de $0,6 \mu\text{g ml}^{-1}$ de solução padrão de sulfato de gentamicina em vez de $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$, porque seria nossa intenção verificar se este efeito interferente era ultrapassado através de um método de adição de padrão, sem haver necessidade de realizar um pré-tratamento das amostras. Contudo, devido aos problemas técnicos ocorridos com o detector bem como ao período limite de apresentação desta dissertação não foi possível prosseguir com estas experiências.

Para o caso da análise das pomadas oftálmicas, os resultados obtidos apresentados na Tabela 3.5 revelam-se bastante mais baixos do que o valor declarado em virtude de, por serem matrizes bastante hidrofóbicas, a extracção da gentamicina não ser completa com as condições de preparação da amostra estabelecidas no ponto 2.1.1.

Tabela 3.5 – Resultados da análise de pomadas oftálmicas contendo gentamicina e dos ensaios de recuperação.

Amostra	Concentração declarada (mg/g de formulação)	Concentração encontrada (mg/g de formulação)*	Recuperação (%)
Gentocil [®]	4,42	$1,77 \pm 0,03$	126
Ophtagram [®]	3,0	$1,69 \pm 0,05$	110
Dexamytrex [®]	5,0	$1,22 \pm 0,05$	98

*Determinações correspondentes à média de 6 ensaios realizados com duas amostras preparadas do mesmo lote.

Embora os resultados apresentem uma boa repetibilidade e reprodutibilidade, são bastante inferiores ao valor declarado no rótulo da formulação farmacêutica. Neste caso também se justifica um estudo posterior sobre processos de extração da gentamicina a partir de matrizes hidrofóbicas, aspecto que será retomado posteriormente.

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O procedimento analítico desenvolvido fornece resultados que demonstram ser possível analisar gentamicina em produtos farmacêuticos recorrendo a um método simples, económico, expedito, robusto e sobretudo amigo do ambiente.

A metodologia proposta permite realizar cerca de 62 determinações por hora, permitindo um ritmo de amostragem superior a outros métodos, anteriormente descritos, para a determinação do mesmo composto [38,39]. Relativamente ao consumo de reagentes, o método descrito consome em cada análise cerca de 18,4 mg de hipoclorito de sódio e 1,48 µg de luminol, o que se traduz na produção de cerca de 2,14 ml de resíduos. Este aspecto representa uma vantagem comparativamente com os métodos descritos na literatura [38,39], que consomem uma maior quantidade de reagentes, sendo alguns deles tóxicos e, conseqüentemente, produzem uma maior quantidade de resíduos. A metodologia proposta apresenta um desvio padrão relativo inferior a 2,1%, sendo este valor inferior ao apresentado pelo método desenvolvido por Li *et al.* [38] (R.S.D. <3,2%). Para além das vantagens enunciadas, a metodologia proposta não necessita de etapas de pré-derivatização da gentamicina com vista à sua detecção [39] ou eventualmente a electrogeração de reagentes [38] o que se traduz na utilização de equipamento menos sofisticado.

A metodologia desenvolvida é, segundo os dados recolhidos na literatura, o primeiro método a ser proposto para a determinação de gentamicina recorrendo a um sistema de multicomutação com detecção por quimiluminescência. Este tem a vantagem de permitir a inserção da amostra e reagentes por amostragem binária, ou seja, através da intercalação de pequenas alíquotas de amostra e reagentes com base num controlo temporizado, assegurando uma rápida homogeneização da zona de reacção e uma reduzida dispersão da amostra, o que facilita o tempo de reacção e também reduz o consumo de reagentes.

Ao permitir a realização de cerca de 62 determinações por hora, a metodologia proposta poderá ser aplicada com sucesso em análises de rotina para o controlo de qualidade de formulações farmacêuticas contendo gentamicina.

Para além da análise de formulações farmacêuticas, os resultados obtidos revelam que a metodologia analítica proposta poderá ser estendida à determinação de gentamicina em outros tipos de amostras, nomeadamente amostras alimentares e ambientais, desde que associada a um processo extractivo eficaz. Para tal poderá ser necessário alterar alguns parâmetros das condições de análise, o que não implica uma

reconfiguração física do sistema. A possibilidade de se poder aplicar o método analítico desenvolvido a diferentes tipos de amostras demonstra a versatilidade do mesmo.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Garret, D. Moura, in: W. Osswald, S. Guimarães (Eds.), *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas*, 4ª Edição, Porto Editora, Porto (2001), 798-821.
- [2] J.C. Sousa, *Manual de Antibióticos Antibacterianos*, 1ª Edição, Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto (2005).
- [3] www.medstudents.com.br/historia/fleming/fleming.htm
- [4] J.M. Pereira, in: W.F.C. Ferreira, J.C.F. Sousa (Eds.), *Microbiologia – Volume I*, 1ª Edição, Lidel, Lisboa (1998), 125-139.
- [5] J.G. Monteiro, F. Brandão, in: W. Osswald, S. Guimarães (Eds.), *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas*, 4ª Edição, Porto Editora, Porto (2001), 863-871.
- [6] D.A. Stead, *Journal of Chromatography B* 747 (2000) 69-93.
- [7] T.R. Zembower, G.A. Noskin, M.J. Postelnick, C. Nguyen, L.R. Peterson, *International Journal of Antimicrobials Agents* 10 (1998) 95-105.
- [8] B.D. Davis, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 22 (1988), 1-3.
- [9] D.N. Gerding, T.A. Larson, R.A. Hughes, M. Weiler, C. Shanholtzer, L.R. Peterson, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35 (1991), 1284-1290.
- [10] M.J. Weinstein, G.M. Luedemann, E.M. Oden, G.H. Wagman, J.P. Rosselet, J.A. Marquez, C.T. Coniglio, W. Charney, H.L. Herzog, J. Black, *Journal of Medicinal Chemistry* 6 (1963), 463-464.
- [11] D.J. Cooper, M.D. Yudis, R.D. Guthrie, A.M. Prior, *Journal of Chemical Society (C)* (1971), 960-963.
- [12] D.J. Cooper, M.D. Yudis, H.M. Marigliano, T. Traubel, *Journal of Chemical Society (C)* (1971), 2876-2879.
- [13] D.J. Cooper, P.J.L. Daniels, M.D. Yudis, H.M. Marigliano, R.D. Guthrie, S.T.K. Bukhari, *Journal of Chemical Society (C)* (1971), 3126-3129.
- [14] *Index Merck*, 11ª Edição, 686-687.
- [15] M.J. Weinstein, G.H. Wagman, E.M. Oden, J.A. Marquez, *Journal of Bacteriology* 94 (1967), 789-790.
- [16] S. Yoshizawa, D. Fourmy, J.D. Puglisi, *The EMBO Journal* 17 (1998), 6437-6448.
- [17] R.S. Edson, C.L. Terrell, *Mayo Clinical Proceedings* 74 (1999), 519-528.
- [18] *Prontuário Terapêutico on-line* (2008). Acedido via:
www.infarmed.pt/prontuario/index.php

- [19] C. Lecároz, M.A. Campanero, C. Gamazo, M.J. Blanco-Prieto, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58 (2006), 557-563.
- [20] C.L. Flurer, K.A. Wolnik, *Journal of Chromatography A* 663 (1994), 259-263.
- [21] A.I. Al-Amoud, B.J. Clark, H. Chrystyn, *Journal of Chromatography B* 769 (2002), 89-95.
- [22] E. Kaale, Y. Long, H.A. Fonge, C. Govaerts, K. Desmet, A.V. Schepdael, J. Hoogmartens, *Electrophoresis* 26 (2005), 640-647.
- [23] D.A. Stead, R.M.E. Richards, *Journal of Chromatography B* 675 (1996), 295-302.
- [24] N.C. Megoulas, M.A. Koupparis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36 (2004), 73-79.
- [25] M. Freeman, P.A. Hawkins, J.S. Loran, J.A. Stead, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2 (1979), 1305-1317.
- [26] E. Adams, W. Roelants, R. De Paepe, E. Roets, J. Hoogmartens, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18 (1998), 689-698.
- [27] H. Curiel, W. Vanderaerden, H.Velez, J. Hoogmartens, A.V. Schepdael, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44 (2007), 49-56.
- [28] C.L. Flurer, K.A. Wolnik, *Journal of Chromatography A* 663 (1994), 259-263.
- [29] E. Kaale, S. Leonard, A.V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *Journal of Chromatography A* 895 (2000), 67-79.
- [30] L.L. Yuan, H.P. Wei, S.F.Y. Li, *Electrophoresis* 26 (2005), 196-201.
- [31] P.D. Voegel, R.P. Baldwin, *Electroanalysis* 9 (1997), 1145-1151.
- [32] E.G. Kulapina, V.V. Baraguzina, O.I. Kulapina, *Journal of Analytical Chemistry* 60 (2005), 523-527
- [33] E.V. Khaldeeva, E.P. Medyantseva, N.A. Imanaeva, G.K. Budnikov, *Journal of Analytical Chemistry* 57 (2002), 1097-1102.
- [34] A.A. Al-Majed, F. Belal, M.A. Abounassif, N.Y. Khalil, *Microchimica Acta* 141 (2003), 1-6.
- [35] M. Rizk, Y. El-Shabrawy, N.A. Zakhari, S.S. Toubar, L.A. Carreira, *Talanta* 42 (1995), 1849-1856.
- [36] H.Y. Wang, J.C. Ren, Y.C. Zhang, *Talanta* 40 (1993), 851-853.
- [37] A.M. El-Didamony, A.S. Amin, A.K. Ghoneim, A.M. Telebany, *Central European Journal of Chemistry* 4 (2006), 708-722.
- [38] B. Li, Z. Zhang, M. Wu, *Analytical Letters* 33 (2000), 1577-1590.

- [39] J.M. Ramos-Fernández, A.M. Garcia-Campaña, F. Alés-Barrero, J.M. Bosque-Sendra, *Talanta* 69 (2006), 763-768.
- [40] R.M. Van Es, S.J. Setford, Y.J. Blankwater, D. Meijer, *Analytica Chimica Acta* 429 (2001) 37-47.
- [41] D.N. Heller, S.B. Clark, H.F. Righter, *Journal of Mass Spectrometry* 35 (2000), 39-49.
- [42] P.J. Kijak, J. Jackson, B. Shaikh, *Journal of Chromatography B* 691 (1997), 377-382.
- [43] B.G. Knecht, A. Strasser, R. Dietrich, E. Märtlbauer, R. Niessner, M.G. Weller, *Analytical Chemistry* 76 (2004), 646-654.
- [44] W. Haasnoot, P. Stouten, G. Cazemier, A. Lommen, J.F.M. Nouws, H.J. Keukens, *Analyst* 124 (1999), 301-305.
- [45] J.M. Serrano, M. Silva, *Journal of Chromatography A* 1117 (2006), 176-183.
- [46] D. Löffler, T.A. Ternes, *Journal of Chromatography A* 1000 (2003), 583-588.
- [47] Monografía “Sulfato de Gentamicina”, *Farmacopeia Portuguesa VIII*, vol. 2, Lisboa, 2005, pp. 2964-2966.
- [48] Monograph “Gentamicin Sulphate” 01/2005:0331 corrected, *European Pharmacopeia*, 5th Ed., European Department for the Quality of Medicines, Strasbourg, France, 2005, pp. 1653-1654.
- [49] Official Monograph “Gentamicin Sulfate”, *United States Pharmacopeia 28/National Formulary 23*, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, 2005, pp. 895-896.
- [50] <81> Antibiotics – Microbial Assays, *United States Pharmacopeia 28/National Formulary 23*, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, 2005, pp. 2256-2263.
- [51] S.I. Kotretsou, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44 (2004), 173-184.
- [52] V. Gaudin, P. Maris, R. Fuselier, J.-L. Ribouchon, N. Cadieu, A. Rault, *Food Additives and Contaminants* 21 (2004), 422-433.
- [53] A.M. Ferrini, V. Mannoni, P. Aureli, *Food Additives and Contaminants* 23 (2006), 16-24.
- [54] C. Gatica, E. Gesche, *Revista Científica, FCV-LUZ* 17 (2007), 231-238.
- [55] M.G. Pikkemaat, S.O.-V. Dijk, J. Schouten, M. Rapallini, H.J. van Egmond, *Food Control* 19 (2008), 781-789.

- [56] J.M. Calatayud, “Flow injection analysis of pharmaceuticals – automation in the laboratory”, Taylor & Francis publishers, (1996).
- [57] F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos, *Analytica Chimica Acta* 468 (2002), 119-131.
- [58] F.R.P. Rocha, C.M.C. Infante, W.R. Melchert, *Spectroscopy Letters* 39 (2006), 651-668.
- [59] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Analytica Chimica Acta* 78 (1975), 145-157.
- [60] J. Ruzicka, G.D. Marshall, *Analytica Chimica Acta* 237 (1990), 329-343.
- [61] B.F. Reis, M.F. Guiné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, *Analytica Chimica Acta* 293 (1994), 129-138.
- [62] V. Cerdà, J.M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar, *Talanta* 50 (1999), 695-705.
- [63] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, *Analytica Chimica Acta* 466 (2002), 125-132.
- [64] A.M. Pimenta, M.C.B.S.M. Montenegro, A.N. Araújo, J.M. Calatayud, *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* 40 (2006), 16-34.
- [65] V. Cerdà, C. Pons, *Trends in Analytical Chemistry* 25 (2006), 236-242.
- [66] V. Cerdà, R. Forteza, J.M. Estela, *Analytica Chimica Acta* 600 (2007), 35-45.
- [67] J.A.V. Prior, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Analytica Bioanalytical Chemistry* 375 (2003), 1234-1239.
- [68] J.A. Vieira, B.F. Reis, E.A.M. Kronka, A.P.S. Paim, M.F. Giné, *Analytica Chimica Acta* 366 (1998), 251-255.
- [69] M.C. Icardo, J.V.G. Mateo, J.M. Calatayud, *Trends in Analytical Chemistry* 21 (2002), 366-378.
- [70] A.F. Lavorante, M.A. Feres, B.F. Reis, *Spectroscopy Letters* 39 (2006), 631-650.
- [71] P.B. Martelli, B.F. Reis, E.A.M. Kronka, H. Bergamim Fº, M. Korn, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, A.N. Araújo, *Analytica Chimica Acta* 308 (1995), 397-405.
- [72] A.M. Garcia-Campaña, W.R.G. Baeyens, *Analisis* 28 (2000), 686-698.
- [73] A.C. Calokerinos, N.T. Deftereos, W.R.G. Baeyens, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 13 (1995), 1063-1071.
- [74] Tese de Doutoramento de Karine Lopes Marques, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto (2006).
- [75] H.O. Albrecht, *Z. Phys. Chem.* 136 (1928), 321.

- [76] W.R. Seitz, W.W. Suydam, D.M. Hércules, *Analytical Chemistry* 44 (1972), 957-963.
- [77] W.R. Seitz, D.M. Hércules, *Analytical Chemistry* 44 (1972), 2143-2149.
- [78] K. Hool, T.A. Nieman, *Analytical Chemistry* 60 (1988), 834-837.
- [79] F.R.P. Rocha, E. Ródenas-Torralba, B.F. Reis, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, *Talanta* 67 (2005), 673-677.
- [80] C.K. Pires, K.L. Marques, J.L.M. Santos, R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, E.A.G. Zagatto, *Talanta* 68 (2005), 239-244.
- [81] K.L. Marques, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Analytical Letters* 40 (2007), 2241-2251.
- [82] H. Paseková, M. Polášek, J.F. Cigarro, J. Dolejšová, *Analytica Chimica Acta* 438 (2001), 165-173.
- [83] N.W. Barnett, C.E. Lenehan, S.W. Lewis, D.J. Tucker, K.M. Essery, *Analyst* 123 (1998), 601-605.
- [84] C. Zhang, J. Huang, Z. Zhang, M. Aizawa, *Analytica Chimica Acta* 374 (1998), 105-110.
- [85] R.W. Min, J. Nielsen, J. Villadsen, *Analytica Chimica Acta* 312 (1995), 149-156.
- [86] A. Townshend, *Analyst* 115 (1990), 495-500.
- [87] J. Li, P.K. Dasgupta, *Analytica Chimica Acta* 398 (1999), 33-39.
- [88] C. Vannecke, E. Van Gyseghen, M.S. Bloomfield, T. Coomber, Y.V. Heyden, D.L. Massart, *Analytica Chimica Acta* 446 (2001), 413-428.
- [89] O.I. Aruoma, *Genetical Pharmacology* 28 (1997), 269-272.
- [90] C.G. Amorim, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, *Talanta* 72 (2007), 1255-1260.
- [91] Index Merck, 11^a Edição, 786-787.
- [92] www.gilson.com
- [93] www.nresearch.com
- [94] International Union of Pure and Applied Chemistry, *Pure & Applied Chemistry* 45 (1976), 99-103.
- [95] M. Thompson, S.L.R. Ellison, A. Fajgelj, P. Willetts, R. Wood, *Pure & Applied Chemistry* 71 (1999), 337-348.
- [96] L.N. Prista, A.C. Alves, R. Morgado, *Tecnologia Farmacêutica*, vol. III, 4^a Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa (1995).