

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE BAURU
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

EVELYN CRISTIANE DA SILVEIRA

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA FARMACOPÉICA PARA ANÁLISE DE SULFATO
DE GENTAMICINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA
APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

BAURU
2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE BAURU
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

EVELYN CRISTIANE DA SILVEIRA

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA FARMACOPÉICA PARA ANÁLISE DE SULFATO
DE GENTAMICINA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA
APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de graduação em
Química do Departamento de Química da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” Campus de Bauru como
requisito das exigências para obtenção do
Título de Licenciado em Química.
Orientador: Valdecir Fárias Ximenes

BAURU
2017

EVELYN CRISTIANE DA SILVEIRA

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA FARMACOPÉICA PARA ANÁLISE DE SULFATO
DE GENTAMICINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA
APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de graduação em
Química do Departamento de Química da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” Campus de Bauru como
requisito das exigências para obtenção do
Título de Licenciado em Química.
Orientador: Valdecir Farias Ximenes

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Rinaldo
Departamento de Química – UNESP

Ms. Josiane Clarice Claudino Leme
Farmacêutica – Santisa Laboratório Farmacêutico, Assuntos Regulatórios

Prof. Dr. Valdecir Faria Ximenes
Departamento de Química – UNESP

Bauru, 20 de dezembro de 2017

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por me dar a vida, e forças para não desanimar nos momentos difíceis da caminhada, sempre me guardando a todo momento.

A minha família por toda a base, educação, amor, compreensão e paciência comigo nos últimos cinco anos de luta, esforço e muitos estudos.

Aos bons amigos que encontrei durante o curso, responsáveis por fazer tudo mais divertido e leve, em especial a Richelly por me aturar desde o primeiro dia de aula, por não me deixar desistir ao comprar-me com um crepe de queijo e por sempre estar presente quando precisei chorar, desabafar, brigar, comer e viajar.

A empresa Santisa que me abriu as portas para um estágio e que me acolheu, me incentivou a crescer e que possibilitou a execução do presente trabalho, em especial a minha Chefe Vanessa, que me deu a oportunidade de aprender e que confiou em mim sempre. A Giovana que jogou essa bucha na minha mão e não tive como pular essa, mas que em todo momento esteve presente, dando ideias, ensinando, brigando, e me ajudando.

Ao meu orientador, que aceitou de pronto me auxiliar neste trabalho, e teve muita paciência comigo.

SILVEIRA, Evelyn Cristiane. **Validação de metodologia farmacopéica para análise de sulfato de gentamicina por cromatografia líquida de alta eficiência para aplicação na indústria farmacêutica.** 2017, 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Licenciatura em Química – Universidade Estadual Paulista Câmpus de Bauru, Bauru, 2017.

RESUMO

A gentamicina é um antibiótico utilizado no tratamento de infecções graves, e age principalmente contra microrganismos gram-negativos aeróbicos, já que para penetrar nas células necessita ser transportados através da membrana celular em um processo que depende de energia e oxigênio. Além de poder ser administrada em conjunto com outros antibióticos para acelerar a absorção da gentamicina pela membrana celular. A gentamicina pertencente à classe dos aminoglicosídeos, onde seu efeito bactericida se dá através da ligação do antibiótico com o ribossomo bacteriano, que em geral ocorre na fração 30s do ribossomo, e alguns aminoglicosídeos também são capazes de ligar-se a fração 50s do ribossomo bacteriano, pois possuem anel 2-deoxi-estreptamina, o resultado é a inibição da síntese proteica ou produção de proteínas defeituosas. A gentamicina é produzida por fermentação da *Micromonospora purpúrea*, e é constituída por uma mistura de isômeros sendo C1, C1a, C2, C2a e C2b que possuem diferentes graus de afinidade com a subunidade 30s do ribossomo bacteriano sendo a gentamicina C1a a que possui maior afinidade seguida pela C2 e a C1 é o componente que possui menor afinidade. A gentamicina e os aminoglicosídeos têm toxicidade comprovada e por esse motivo as doses devem ser controladas, apesar disso são substâncias que não apresentam resistência do organismo. Na indústria farmacêutica a análise de gentamicina pode ser realizada empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE com detecção por UV-Vis ou detecção amperométrica, porém pela dificuldade que há na detecção amperométrica relacionada ao equipamento necessário a detecção por UV-Vis torna-se mais viável. A gentamicina não possui grupos cromóforos por esse motivo é necessário que a molécula seja submetida a um processo de derivação utilizando o-ftalaldeído. Para a indústria existem metodologias consideradas oficiais que a ANVISA exige que sejam seguidas, baseando-se nas Farmacopeias além da necessidade de validação do método de acordo com requisitos exigidos pelo mesmo.

Palavra-chave: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Gentamicina, Validação.

SILVEIRA, Evelyn Cristiane. **Validação de metodologia farmacopéica para análise de sulfato de gentamicina por cromatografia líquida de alta eficiência para aplicação na indústria farmacêutica.** 2017, 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Licenciatura em Química – Universidade Estadual Paulista Câmpus de Bauru, Bauru, 2017.

ABSTRACT

Gentamicin is an antibiotic used without treatment of serious infections, and acts mainly against gram-negative aerobic microorganisms, since to penetrate the cells it needs to be transported through the cell membrane in a process of energy and oxygen. In addition to being able to be administered together with other antibiotics to accelerate the absorption of gentamicin by the cell membrane. Gentamicin belonging to the class of aminoglycosides, where its bactericidal effect occurs through the attachment of the antibiotic to the bacterial ribosome, which usually occurs in the 30s fraction of the ribosome, and some aminoglycosides are also capable of binding to the 50s fraction of the bacterial ribosome, since it is a 2-deoxy-streptamine element, the result is an inhibition of protein synthesis or production of defective proteins. Gentamicin is produced by fermentation of *Micromonospora purpurea*, and consists of a mixture of isomers being C1, C1a, C2, C2a and C2b which has different degrees of affinity with a 30s subunit of the bacterial ribosome being a C1a gentamicin that has higher affinity for C2 and C1 is the component with the lowest affinity. Gentamicin and aminoglycosides have proven toxicity and therefore as doses are to be controlled, nonetheless they are substances not related to the resistance of the organism. In the pharmaceutical industry, a gentamicin analysis can be performed from a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with UV-Vis detection or amperometric detection, but due to the difficulty of having an amperometric detection related to the equipment necessary for UV-Vis detection becomes more feasible. Gentamicin has no chromophore groups, so it is necessary for the molecule to undergo a derivatization process, use o-phthalaldehyde. For an industry of methodologies considered to be ANVISA requires that they be followed, based on the Pharmacopoeias besides the need to validate the method according to the requirements demanded by it.

Key words: High Performance Liquid Chromatography, Gentamicin, Validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química e principais componentes da gentamicina. Fonte: USP36, 2013. .	12
Figura 2. Padrão conservado em ambiente adequado.	24
Figura 3. Padrão exposto ao ambiente.	24
Figura 4. Amostra conservada em ambiente adequado.	24
Figura 5. Amostra exposta ao ambiente	25
Figura 6. Padrão de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml do teste de Repetibilidade.....	40
Figura 7. Amostra 1 de sulfato de gentamicina do teste de repetibilidade.....	40
Figura 8. Amostra 2 de sulfato de gentamicina do teste de repetibilidade.....	41
Figura 9. Amostra 3 de sulfato de gentamicina do teste de repetibilidade.....	41
Figura 10. Amostra 4 de sulfato de gentamicina do teste de repetibilidade.....	41
Figura 11. Amostra 5 de sulfato de gentamicina do teste de repetibilidade.....	42
Figura 12. Amostra 6 de sulfato de gentamicina do teste de repetibilidade.....	42
Figura 13. Padrão de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.	42
Figura 14. Amostra 1 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.	43
Figura 15. Amostra 2 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn	43
Figura 16. Amostra 3 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn	43
Figura 17. Amostra 4 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn	44
Figura 18. Amostra 5 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn	44
Figura 19. Amostra 6 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn	44
Figura 20. Padrão de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Evelyn.	45
Figura 21. Amostra 1 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.	45
Figura 22. Amostra 2 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.	45
Figura 23. Amostra 3 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.	46
Figura 24. Amostra 4 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.	46
Figura 25. Amostra 5 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.	46
Figura 26. Amostra 6 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.	47
Figura 27. Padrão de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.	47
Figura 28. Amostra 1 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.	47
Figura 29. Amostra 2 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.	48
Figura 30. Amostra 3 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.	48

Figura 31. Amostra 4 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.	48
Figura 32. Amostra 5 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.	49
Figura 33. Amostra 6 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.	49
Figura 34. Padrão de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.	50
Figura 35. Amostra 1 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.	50
Figura 36. Amostra 2 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.	50
Figura 37. Amostra 3 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.	51
Figura 38. Amostra 4 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.	51
Figura 39. Amostra 5 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.	51
Figura 40. Amostra 6 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.	52
Figura 41. Padrão de Sulfato de gentamicina a 80% replicata 1 do teste de Exatidão.	53
Figura 42. Padrão de Sulfato de gentamicina a 80% replicata 2 do teste de Exatidão.	53
Figura 43. Padrão de Sulfato de gentamicina a 80% replicata 3 do teste de Exatidão.	53
Figura 44. Padrão de Sulfato de gentamicina a 100% replicata 1 do teste de Exatidão.	54
Figura 45. Padrão de Sulfato de gentamicina a 100% replicata 2 do teste de Exatidão.	54
Figura 46. Padrão de Sulfato de gentamicina a 100% replicata 3 do teste de Exatidão.	54
Figura 47. Padrão de Sulfato de gentamicina a 120% replicata 1 do teste de Exatidão.	55
Figura 48. Padrão de Sulfato de gentamicina a 120% replicata 2 do teste de Exatidão.	55
Figura 49. Padrão de Sulfato de gentamicina a 120% replicata 3 do teste de Exatidão.	55
Figura 50. Padrão de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml replicata 1 do teste de Seletividade.	56
Figura 51. Padrão de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml replicata 2 do teste de Seletividade.	56
Figura 52. Padrão de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml replicata 3 do teste de Seletividade.	56
Figura 53. Amostra de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml replicata 1 do teste de Seletividade.	57
Figura 54. Amostra de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml replicata 1 do teste de Seletividade.	57
Figura 55. Amostra de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml replicata 1 do teste de Seletividade.	57
Figura 56. Diluente – Água Purificada - replicata 1 do teste de Seletividade.	58
Figura 57. Diluente – Água Purificada - replicata 2 do teste de Seletividade.	58
Figura 58. Diluente – Água Purificada - replicata 3 do teste de Seletividade.	58
Figura 59. Diluente – Água isopropanol e o-ftalaldeído - replicata 1 do teste de Seletividade.	59
Figura 60. Diluente – Água isopropanol e o-ftalaldeído - replicata 2 do teste de Seletividade.	59
Figura 61. Diluente – Água isopropanol e o-ftalaldeído - replicata 3 do teste de Seletividade.	59

Sumário

1-Introdução	10
1.1-Antibióticos aminoglicosídeos – Considerações gerais	10
1.2 – Gentamicina.....	11
1.2.1 – Métodos de análise para determinação de Gentamicina	13
1.3 - Cromatografia Líquida de alta eficiência – CLAE	14
1.4 – Validação de metodologia.....	18
1.4.1 – Seletividade.....	18
1.4.2 – Precisão	18
1.4.3 - Exatidão	19
2- Objetivos	19
2.1 – Objetivo Específico	19
3 – Metodologia	20
3.1 – Preparo das Soluções.....	20
3.2 – Sistema Cromatográfico	21
3.3 – Critérios de Aceitação.....	22
4 - Resultados	22
4.1 – Análise preliminar das condições de preparo, armazenamento e preparo das amostras.....	22
4.1.1 - Estabilidade da amostra.....	22
4.1.2 – Exposição.....	23
4.1.3 - Derivação	25

4.2 – Validação do método segundo RDC166, de 2017.....	28
4.2.1 – Exatidão	28
4.2.2 – Precisão	29
4.2.3 – Seletividade.....	34
5 – Discussão.....	35
6 – Conclusão	36
Referências	37
ANEXOS	39
ANEXO I – Cromatograma da validação do método - Precisão.....	40

1-Introdução

1.1-Antibióticos aminoglicosídeos – Considerações gerais

Os aminoglicosídeos são antibacterianos com um amplo espectro bactericida e agem principalmente contra microrganismos aeróbicos e bacilos gram-negativos, como a *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e Espécies de *Salmonella* além de alguns agentes patogênicos gram-positivos como *Staphylococcus* e alguns *estreptococos*, porém são ineficazes contra microrganismos anaeróbicos (RENAME,2010). São caracterizados por possuírem aminoaçúcares ligados a componentes aminocitol por meio de ligações glicosídicas, além de possuírem um grande número de aminas e hidroxilas como radicais o que os caracteriza como substâncias básicas de caráter polar (ZEMBOWER, 1998).

São comumente encontrados na forma de sal, geralmente sulfatos, e por esse motivo são altamente solúveis em água enquanto seu caráter polar implica na insolubilidade em lipídeos, sendo assim os aminoglicosídeos são pouco absorvidos pelo trato gastrointestinal, mas penetram na barreira hemato encefálica (ZEMBOWER, 1998).

O efeito bactericida dos aminoglicosídeos se dá através da ligação do composto ao ribossomo bacteriano, em geral na fração 30s, porém alguns aminoglicosídeos possuem anel 2-deoxi-estreptamina sendo capazes de se ligarem a subunidade 50S, o resultado é a inibição da síntese proteica ou produção de proteínas defeituosas, pois o ribossomo é o responsável pela síntese polipeptídica. Para isso, os aminoglicosídeos interagem eletrostaticamente com resíduos contidos na membrana externa de bacilos gram-negativos em um processo com o menor gasto de energia possível, pois o transporte através da membrana celular depende de energia e oxigênio, isso só ocorre em microrganismos aeróbicos (ZEMBOWER,1998).

O desenvolvimento de resistência durante o tratamento utilizando algum aminoglicosídeo é raro e existem 3 mecanismos conhecidos, sendo eles: a alteração dos sítios de ligação no ribossomo, a alteração na permeabilidade e a modificação enzimática da droga. Os genes que conferem resistência são constitutivos, ou seja, não são causados pela presença do medicamento (ANVISA, 2007). Os aminoglicosídeos também são medicamentos de baixo custo e baixo risco de alergias e por esses motivos são largamente utilizados, mesmo sendo comprovada a sua alta

toxicidade, ototoxicidade e nefrotoxicidade, assim sendo necessário que as doses sejam bem definidas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A administração dos aminoglicosídeos deve ser feita por via intravenosa ou intramuscular, já que são pouco absorvíveis via oral, sendo utilizado dessa maneira somente em casos de descontaminação da flora intestinal utilizando neomicina. Suas atividades bactericidas estão diretamente ligadas à sua concentração, quanto maior a concentração do antibiótico mais rápido é o efeito bactericida, os aminoglicosídeos distribuem-se bem no meio extracelular, pois são altamente solúveis, mas a concentração intracelular é baixa já que depende de transporte ativo para ser absorvido. Os níveis máximos séricos são obtidos entre 60 a 90 segundos após a administração do medicamento por via intramuscular ou cerca de 30 minutos através de infusão intravenosa (ANVISA, 2007).

Os aminoglicosídeos são nefrotóxicos, efeito que algumas substâncias têm sobre os rins e esta condição se manifesta após cerca de sete a dez dias de tratamento, apresentando-se como uma insuficiência renal aguda do tipo não oligúrica, por necrose tubular aguda, sendo uma condição reversível com a suspensão do uso do medicamento. Há alguns fatores que aumentam o risco de o paciente desenvolver essa condição, como o uso concomitante de outras drogas nefrotóxicas, idade avançada, doença hepática subjacente, uso prévio de aminoglicosídeos e estados hipovolêmicos (ANVISA, 2007).

O primeiro aminoglicosídeo obtido foi a estreptomicina a partir do fungo *Streptomyces griseus* em 1944, sendo uma das principais drogas utilizadas atualmente, além da tobramicina, amicacina, netilmicina, paramomicina, espectinomicina e a gentamicina, que é tema do presente trabalho. (ANVISA, 2007).

1.2 – Gentamicina

A gentamicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, e por esse motivo tem ação contra microrganismos gram-negativos aeróbicos. É utilizada para tratar infecções graves como o *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, e quando associada com outros fármacos como betalactâmicos e vancomicina é utilizada para o tratamento de infecção sistêmica grave, a associação de outros fármacos possibilita maior penetração intracelular da gentamicina, o que resulta em uma ampliação do

espectro de ação do medicamento contra bactérias gram-positivas aeróbicas e anaeróbicas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006)

Como todos os aminoglicosídeos a gentamicina em geral é administrada por via intravenosa ou intramuscular já que não é bem absorvida de forma oral, podendo também ser utilizada em soluções oftalmológicas e tópicas (ANDRADE, 2015).

A gentamicina é um antibiótico produzido por fermentação da *Micromonospora purpúrea* e é constituída por uma mistura de isômeros identificadas como Gentamicina C1, C1a, C2, C2a e em menor quantidade C2b, como mostra a Figura 1 (RENAME, 2010). Seus componentes C são considerados pseudo-trissacarídeos, contendo garosamina e purpurosamina ligadas glicosidicamente à 2-deoxiestreptamina (ANDRADE, 2015).

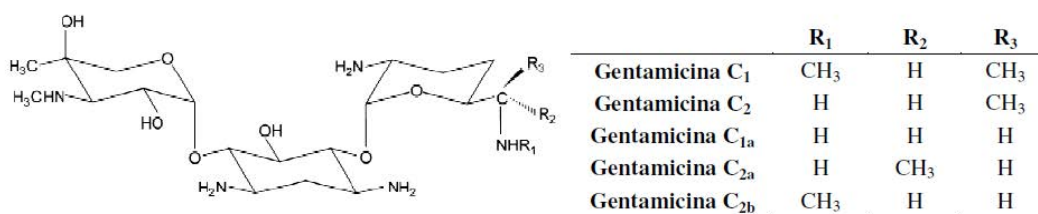


Figura 1. Estrutura química e principais componentes da gentamicina. Fonte: USP36, 2013.

É um fármaco com um espectro amplo de ação, podendo ser ministrado tanto sozinho quanto associado a outros antibióticos. Seu mecanismo de ação é idêntico ao dos aminoglicosídeos, porém com a diferença de que os três componentes principais possuem diferente graus de afinidade com a subunidade 30s do ribossomo, onde a gentamicina C1a possui maior afinidade ligando-se subitamente ao ribossomo, enquanto a C2 possui uma afinidade ligeiramente inferior, e por sua vez a C1 é o componente com menos afinidade. Apesar da diferença de afinidade dos três componentes majoritários da gentamicina não se verifica diferenças destacáveis no espectro de ação. (RENAME, 2010)

A gentamicina é um aminoglicosídeo e como tal é comumente encontrada na forma de sais de sulfato, sendo um pó branco, higroscópico e facilmente solúvel em água, moderadamente solúvel em metanol, etanol e acetona, e quase insolúvel em benzeno e hidrocarbonetos halogenados. (ANDRADE, 2015)

1.2.1 – Métodos de análise para determinação de Gentamicina

Existem vários métodos que podem ser aplicados para a determinação de gentamicina como é possível verificar em várias bibliografias além de metodologias oficiais dos órgãos regulamentadores. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional da Vigilância Sanitária) define as metodologias oficiais que devem ser seguidas pela indústria farmacêutica. A RDC 17, de 16/04/2010 no artigo 212 define que revisões periódicas devem ser realizadas de modo a assegurar que as especificações estejam atualizadas conforme novas edições da farmacopeia nacional ou outros compêndios oficiais (ANVISA, 2010), dando preferência a métodos definidos pela farmacopeia norte americana (USP – United States Pharmacopoeia), porém se nenhum método puder ser utilizado, ou não existir metodologia oficial autoriza-se o desenvolvimento de uma nova metodologia de análise.

Na farmacopeia brasileira não há metodologia descrita para análise de gentamicina. Já na USP há mais de uma metodologia para o teste Conteúdos de Gentamicina para matéria prima, isso porque uma nova edição é feita todos os anos, na USP 38 de 2015 e 39 de 2016, o método empregado é o LC ou Cromatografia Líquida, utilizando um detector amperométrico, porém na USP 36 de 2013 o método descrito é LC com Detecção UV-Vis, enquanto na farmacopeia europeia de 2015 encontramos o método cromatográfico associado à detecção amperométricas.

A detecção amperométricas baseia-se na capacidade que um composto tem de oxidação e redução, enquanto a detecção se dá por um eletrodo específico, geralmente um polarógrafo de gota de mercúrio, onde há um par de eletrodos que aplica um potencial que cria uma corrente de difusão, como a quantidade de corrente é uma medida direta da concentração o processo é quantitativo (LANÇAS, 2009)

Porém a utilização desse tipo de detector é pequena em LC, já que nem todas as substâncias são eletroativas, além da dificuldade de obtenção desse tipo de detector, já que algumas marcas não possuem esse equipamento em sua linha de produção ou que possam ser acoplados à cromatógrafos, sendo necessária a compra de um novo aparelho especialmente para esse detector. Por esse motivo a utilização do detector UV-Vis é muito mais interessante para a indústria já que esse detector é de longe o mais empregado em LC atualmente. (LANÇAS, 2009)

Na estrutura da gentamicina não há ligações insaturadas, ou potenciais grupos cromóforos e fluoróforo, por isso o antibiótico interage fracamente com a radiação da

região do UV-VIS, e fluorescência, a ausência desses grupos torna necessária a utilização de reagentes de derivação que proporcionem a detecção dessas substâncias (ANDRADE, 2015).

Para a escolha do reagente que irá ser utilizado na derivação deve-se considerar algumas coisas, como, o tipo de detecção, sua estabilidade, facilidade de reação com o analito, custo, toxicidade e devem ser de fácil separação, além de que nem o reagente nem um possível produto de degradação devem interferir na detecção do analito. Existem dois tipos comuns de reagentes de derivação, os que proporcionam detecção através do UV-Vis, e os que proporcionam detecção por fluorescência, onde deverão possuir meios para reagir com o analito aliado a um grupo cromóforo ou fluoróforo, no caso da derivação de adiciona um grupo cromóforo o reagente precisa ter dois grupos funcionais, um para reagir com o analito e outro para proporcionar a detecção por UV-Vis, já para a detecção por fluorescência além do grupo que reage como analito deve haver também um grupo fluoróforo capaz de gerar fluorescência intensa (LANÇAS, 2009).

Existem vários reagentes que podem ser utilizados para a derivação, um deles é o o-ftalaldeído (OPA), que pode ser utilizado tanto para detecção por UV quanto por fluorescência, além do baixo custo. A maioria dos métodos descritos para a determinação de gentamicina utiliza o OPA como reagente para a derivação (ANDRADE, 2015), inclusive a metodologia trazida pela USP 36 em 2013.

Como a gentamicina é uma mistura de compostos, uns em maior quantidade, outros em menor quantidade, e faz-se necessária a realização de um processo de derivação é preciso cuidado na interpretação dos dados obtidos para não gerar dúvidas quanto ao método.

1.3 - Cromatografia Líquida de alta eficiência – CLAE

Cromatografia é uma técnica de separação na qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma fixa e de grande área superficial chamada de fase estacionária, e outra que elui pelo sistema arrastando o analito de interesse, chamada de fase móvel (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia líquida é um processo físico, onde temos a fase estacionária e a fase móvel. A fase estacionária encontra-se acondicionada dentro da coluna onde a fase móvel irá eluir continuamente. O analito que apresenta maior interação com a

fase estacionária ficará retido, e levará um tempo maior para percorrer toda a coluna, já o que apresenta maior interação com a fase móvel irá deslocar-se mais rapidamente pela coluna (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia líquida em coluna era praticada em colunas abertas a pressão e temperatura ambiente até a década de 1970, e as frações eram coletadas em tubos de ensaios e a diferença de massa entre os tubos fornecia a massa da amostra obtida. Atualmente é possível notar uma mudança substancial na técnica da cromatografia líquida; a coluna é fechada em ambas as extremidades, e pode ser utilizada inúmeras vezes característica que possibilita o emprego de processos de empacotamento mais caros e aprimorados, já que este custo será diluído dentre as muitas análises, resultando em colunas de melhor qualidade, com partículas menores e mais homogêneas que levam a um melhor resultado. Além de técnicas de injeção mais precisas, e bombas que empurram a fase móvel através da coluna, o que permite um melhor controle da vazão empregada, e da pressão do sistema, já que este passou a ser um sistema fechado. Detectores também foram incluídos, permitindo um monitoramento contínuo da amostra, a quantificação do analito. Este novo sistema resulta em um maior controle de todas as variáveis envolvidas no processo, além de um tempo menor (LANÇAS, 2009).

O principal material utilizado como fase estacionária é a sílica ou óxidos de silício, onde a mais utilizada é a sílica gel SiO_2 , que é uma molécula parcialmente hidratada e com elevado número de poros, e pode ser classificada em tipo A ou B, ou as fases quimicamente ligadas que são mais estáveis e obtidas através de reações química entre a sílica e diferentes grupos funcionais (LANÇAS, 2009), que estão relacionados na tabela 1 a seguir:

Tabela 1. Principais tipos de materiais de empacotamento empregados nas colunas de cromatografia líquida (LANÇAS, 2009).

Abreviatura Comum	Nome do Grupo	Observações
C1	Metil	Empregados em fase reversa (RP);
C2	Etil	Menor retenção (análise mais rápida) que C18;
C4	Butil	Empregados na análise de fármacos, proteínas, peptídeos, produtos naturais, pesticidas.
C6	Hexil	
C8	Octil	Emprego em RP; C8 apresenta retenção menor que C-18;
C18	Octadecil	C-18 é a fase mais usada em CLAE.
Φ	Fenilpropil	Fase reversa, fase normal e IPC; Retenção similar a C-18, mas devido ao grupo fenila apresenta maior seletividade para aromáticos.
CN	Cianopropil	Fase reversa ou normal, dependendo do eluente. Seletivo para insaturações em RP.
NO ₂	Nitrofenilpropil	Fase normal; principal uso é para separação de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (PAH's) e compostos insaturados
NH ₂	Aminopropil	Fase normal, Fase reversa (carboidratos), troca iônica (trocador fraco). Evitar cetonas e aldeídos na fase móvel, solvente e amostra.
OH	Diol	Fase normal (polaridade entre CN e sílica); fase reversa (retenção moderada)
N(CH ₃) ₂		WAX (Trocador fraco de íons – aniônico)
SO ₃ Na		SCX (Trocador forte de íons – catiônico)
N(CH ₃) ₃		SAX (Trocador forte de íons – aniônico)
COONa		WCX (Trocador fraco de íons – catiônico)

Fonte: LANÇAS, 2009

Com relação a fase móvel empregada, esta deve possuir alguns requisitos como solubilizar todos os componentes da amostra sem decompor seus componentes; apresentar baixa ou nenhuma reatividade; possuir baixa viscosidade e ponto de ebulição; baixa ou nenhuma toxicidade; estar disponível em um elevado grau de pureza ou fácil purificação, e se possível possuir baixo preço; não decompor ou dissolver a fase estacionária, ser compatível com o tipo de detector utilizado, e em misturas ter miscibilidade completa (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).¹

Também deve-se considerar se a análise será realizada em fase normal ou em fase reversa, pois a fase normal é caracterizada por fases móveis pouco polares e fases estacionárias relativamente mais polares possibilitando que composto que

possuem mais afinidade com a fase estacionária possa ser eluido com uma pequena mudança na polaridade da fase móvel. Na fase reversa a fase estacionária é apolar e a fase móvel composta por solventes apolares, podendo ser água com metanol, acetonitrila, tetrahidrofurano, ou uma solução tampão, por exemplo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência possuem basicamente um reservatório da fase móvel, uma bomba de alta pressão, um injetor, forno onde acoplasse a coluna, o detector e um sistema de aquisição dos dados. Existe uma grande variedade de cromatógrafos líquidos no mercado de diferentes marcas, custo, versatilidade e complexidade, além da grande variabilidade de detectores que podem ser acoplados, estes são os componentes mais caros e sofisticados do sistema cromatográfico (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Existem vários tipos de detectores diferentes e a escolha de um detector está diretamente ligada a amostra que será analisada. O Detector mede de forma contínua alguma propriedade física ou química da amostra e transmite um sinal ao receptor que em geral é proporcional a concentração. Os detectores podem ser classificados como universal ou seletiva, de acordo com sua capacidade de trabalhar com diferentes tipos de substancias, porem uma boa parte dos detectores não é universal somente alguns possuem uma faixa de trabalho grande, mas mesmo assim possuem suas limitações. Além disso há detectores considerados destrutivo e não destrutivos, sendo os detectores óticos por absorbância no ultravioleta, infravermelho, fluorescência e por índice de refração os não destrutivos, e os detectores eletroquímicos e espectrômetros de massas os destrutivos. A principal vantagem dos detectores não destrutivos é a possibilidade de ter mais de um detector no mesmo cromatógrafo para obter mais de um resultado, ou ainda a posterior caracterização (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O detector mais utilizado atualmente é o UV-Vis, devido a flexibilidade para a escolha do solvente nessa região, pois não é interessante que o solvente interfira na análise, além de ser um detector versátil e com um custo relativamente baixo frente a outros tipos de detectores (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência vem sendo empregada para a determinação de gentamicina com muito sucesso, desde a análise de resíduos até para estudos de estabilidade e doseamento na preparação farmacêutica, devido a sua sensibilidade, exatidão e especificidade. Isso é muito importante já que

aminoglicosídeos como a gentamicina são extremamente tóxicos e por isso um considerável esforço tem sido atribuído a análise de seu conteúdo (LANÇAS, 2009).

1.4 – Validação de metodologia

De acordo com a RDC 17, de 16/04/2010, os métodos utilizados para análises devem ser validados antes de serem introduzidos à rotina de análises do controle de qualidade (ANVISA, 2010), enquanto a RDC 166, de 24/07/2017 define os parâmetros que devem ser avaliados durante a validação de uma metodologia (ANVISA, 2017).

A validação é realizada para verificar a capacidade do método de produzir resultados confiáveis e que é adequado a finalidade pretendida. A utilização de métodos analíticos não oficiais requer uma validação mais detalhada enquanto a validação de um método oficial é realizada de forma parcial, avaliando somente os parâmetros de precisão, exatidão e seletividade do método (ANVISA, 2017).

1.4.1 – Seletividade

A seletividade do método deve demonstrar a capacidade de identificação ou quantificação apenas do analito de interesse na presença de possíveis componentes presentes na amostra. Sendo que no caso de método destinado a quantificação deve-se comprovar que não há interferentes do diluente, da matriz, de alguma possível impureza ou possíveis produtos de degradação. Para demonstrar a ausência de produtos de degradação, um ensaio de degradação forçada deve ser conduzido expondo a amostra a ampla faixa de pH, oxidação, calor e luz (ANVISA, 2017).

1.4.2 – Precisão

A precisão avalia a proximidade de resultados obtidos por meio de ensaios conduzidos como descrito na metodologia em questão, sendo expressa por meio de repetibilidade e precisão intermediária onde a precisão é verificada através de medidas de dispersão da série de medições realizadas (ANVISA, 2017).

De acordo com a RDC 166, o ensaio de repetibilidade deve ser conduzido de maneira a avaliar 6 replicatas de amostras preparadas de maneira independente não podendo ser diluídas a partir de uma solução mãe, e submetidas as mesmas

condições de análise, mesmo analista e mesma instrumentação. Enquanto a precisão intermediária é uma repetibilidade realizada em dois dias distintos, sendo as amostras preparadas por dois operadores distintos, e deve demonstrar proximidade satisfatória entre resultados (ANVISA,2017).

1.4.3 - Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser verificada por meio de 9 determinações que sigam um intervalo linear de 3 concentrações utilizadas na metodologia em questão, devendo ser uma concentração baixa, uma média e uma alta além de ser realizada em triplicatas. Para a matéria prima a RDC 166 determina que deve ser utilizada substancia de pureza conhecida para a determinação da exatidão, ou seja, um padrão SQR (substancia química de referência), e que as amostras devem ser preparadas de forma independente, mas podendo ser diluídas a partir de uma solução mãe (ANVISA,2017).

2- Objetivos

A existência de uma metodologia oficial reconhecida pelo órgão regulamentador facilita muito a rotina laboratorial em uma indústria farmacêutica que fabrique tal medicamento. Oficialmente o teor da gentamicina é feito por ensaios microbiológico segundo metodologia trazida pela farmacopeia, porem na matéria prima existe um teste específico para a determinação de Conteúdos de Gentamicina, método este que pode ser conduzido por CLAE com detector UV-Vis. Sendo este o objetivo geral do presente trabalho, a implementação de metodologia baseada na farmacopeia USP 36, para análise de sulfato de gentamicina matéria prima segundo teste Conteúdos de gentamicina e Validação do método.

2.1 – Objetivo Específico

- Verificar melhores condições de derivação da gentamicina utilizando OPA;
- Verificar se o método é reprodutível;

- Validar o método conforme RDC 166 de 24/07/2017.

3 – Metodologia

3.1 – Preparo das Soluções

Solução de hidróxido de potássio 8 N

Para preparar 100 mL de solução, solubilizado 44,89 gramas de hidróxido de potássio em água completando o volume de um balão volumétrico de 100 mL.

Solução de ácido bórico 0,4 M com ácido tio glicólico – pH 10,4

Solubilizou-se 2,47 gramas de ácido bórico em água para 100 mL de solução, e foram acrescentados 2 mL de ácido tio glicólico PA.

Em seguida o pH foi ajustado para 10,4 com a solução de hidróxido de potássio 8 N preparada anteriormente.

Solução de o-ftalaldeído

Foi pesado 10 mg de o-ftalaldeído que solubilizado em 50 µL de metanol e 950 µL da solução de ácido bórico 0,4 M com ácido tio glicólico.

Solução padrão de gentamicina

O padrão primário de gentamicina utilizado é um padrão USP, que possui potência de 69,7%, ou seja, a cada 1 mg de material seco equivale a 0,697 mg de gentamicina.

Para preparar uma solução padrão estoque de concentração 1 mg/mL pesou-se 14,35 mg de padrão primário USP, e solubiliza-se em água para o volume de 10 mL.

Na hora do uso essa solução é diluída de forma que sua concentração final seja de 0,65 mg/mL utilizando como diluente água.

Desta solução foi transferido 400 μL para um vial de 1mL, 440 μL de álcool isopropílico e 160 μL da solução de o-ftalaldeído. Que resulta em uma concentração final de 0,36 mg/mL.

Aqueceu em banho maria a solução padrão a 60°C por 15 minutos.

Solução amostra

Mesmo procedimento realizado na solução padrão.

Fase móvel

Misturou-se 700 mL de metanol com 250 mL de água e 50 mL de ácido acético glacial PA e foi solubilizado 5 g de ácido 1-heptanosulfonato de sódio.

3.2 – Sistema Cromatográfico

Equipamento: Cromatógrafo Líquido equipado com detector UV-VIS - Jasco

Comprimento de onda: 330nm.

Coluna: Phenomenex C18, 4,6mmx115cm poro de 5 μm .

Vazão: 1ml/min.

Volume de injeção: 20 μL .

Tempo de corrida: 30 min.

Temperatura da coluna: 40°C

Adequação do sistema: Analisou-se 6 replicatas da solução padrão e as respostas do pico conforme indicado no procedimento: a resolução, entre dois picos não é menor que 1,25, o fator capacidade é determinado a partir da gentamicina c1, a eficiência da coluna determinada a partir do pico da gentamicina c2 que não é inferior a 1200 pratos teóricos e o desvio padrão relativo das áreas não é superior a 2%.

A ordem de eluição é gentamicina C1, gentamicina C1a, gentamicina C2a e gentamicina C2.

3.3 – Critérios de Aceitação

O cálculo utilizado para determinar a porcentagem dos conteúdos de gentamicina é:

$$100 \frac{r_f}{r_s} \quad (1)$$

Onde:

r_f : área obtida correspondente a cada gentamicina na solução amostra.

r_s : soma das áreas de todos os picos de gentamicina na solução padrão.

O Limite para gentamicina C1 é entre 25% a 50%, para gentamicina C1a é entre 10% a 35% e a soma da gentamicina C2a e C2 é entre 25% a 55%.

4 - Resultados

4.1 – Análise preliminar das condições de preparo, armazenamento e preparo das amostras.

4.1.1 - Estabilidade da amostra

De acordo com a farmacopeia britânica, a amostra deve ser analisada em até 3 horas após o seu preparo, pois não é uma solução analítica estável. Para verificar tal informação, amostra e padrão foram analisados logo após o preparo e após 3 horas.

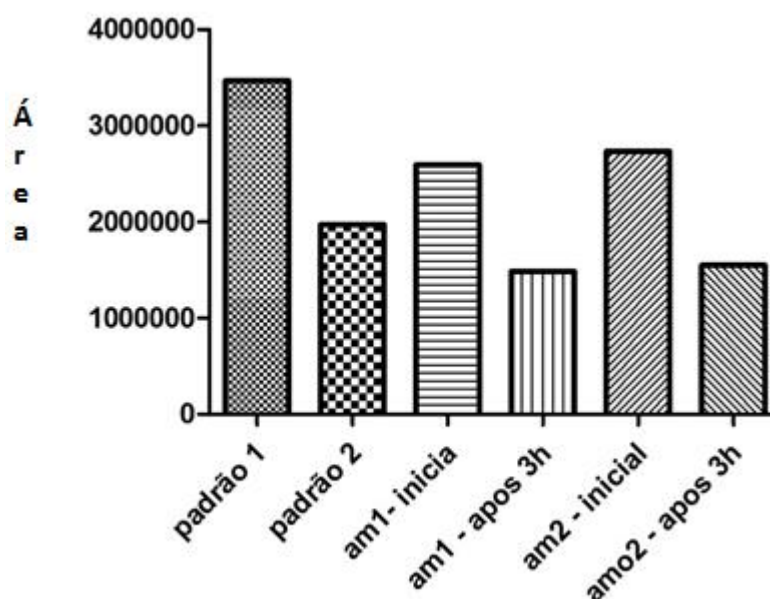


Gráfico 1. Variação do tempo de leitura das amostra e padrão. Soma das áreas dos picos obtidos.

É possível verificar através do gráfico 1, é que após três horas as amostras apresentaram áreas muito menores que a leitura inicial, inclusive o padrão mostrando a instabilidade da solução e que as amostras devem ser lidas logo após o termino da derivação.

4.1.2 – Exposição

O sulfato de gentamicina é caracterizado como um pó branco, porem quando exposto ao ambiente em meio a umidade e calor nota-se que o pó passa a apresentar uma coloração levemente amarelada, além de adsorver umidade. Visto isso, testes foram feitos para verificar quão afetada uma análise pode ser caso uma amostra não esteja em perfeitas condições de armazenamento. Tanto amostra quanto padrão foram expostos as condições ambientes por uma semana enquanto uma outra porção de amostra e padrão estavam armazenados de forma correta, em ambiente seco e refrigerado.

Os resultados obtidos mostram que a exposição a umidade, ao calor e a luz prejudicam a qualidade da amostra e do padrão já que as áreas e a intensidade dos picos diminuíram consideravelmente nas amostras expostas como é possível verificar nas Imagens 2, 3, 4 e 5 e na Tabela 2, a seguir. Isso porque o sulfato de gentamicina

é uma substância higroscópica e em contato com a umidade se hidrata, essa hidratação confere um erro na análise no momento do preparo da amostra já que ao pesar a amostra uma parte dela será água.

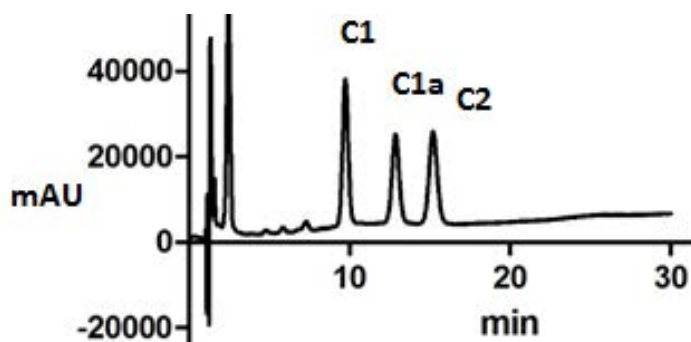


Figura 2. Cromatograma da solução padrão conservado em ambiente adequado.

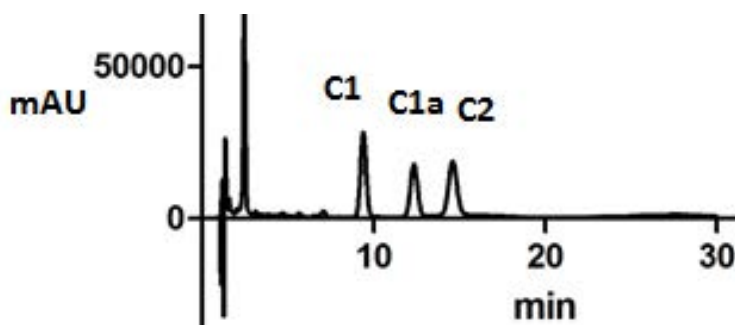


Figura 3. Cromatograma da solução padrão exposto ao ambiente.

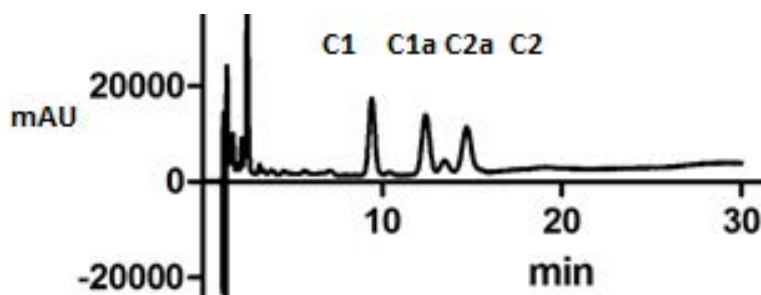


Figura 4. Cromatograma da solução amostra conservada em ambiente adequado.

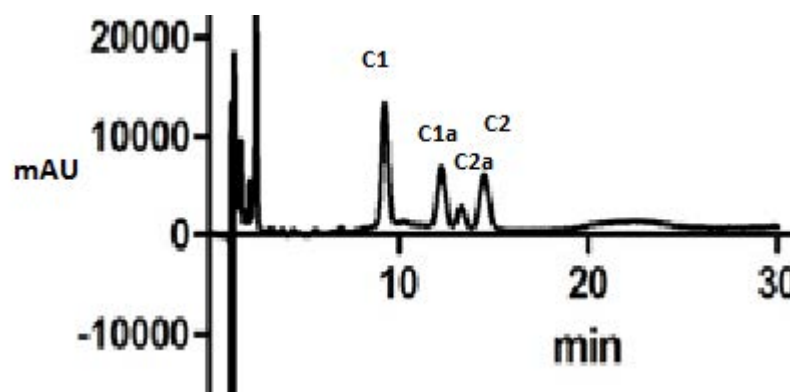


Figura 5. Cromatograma da solução amostra exposta ao ambiente

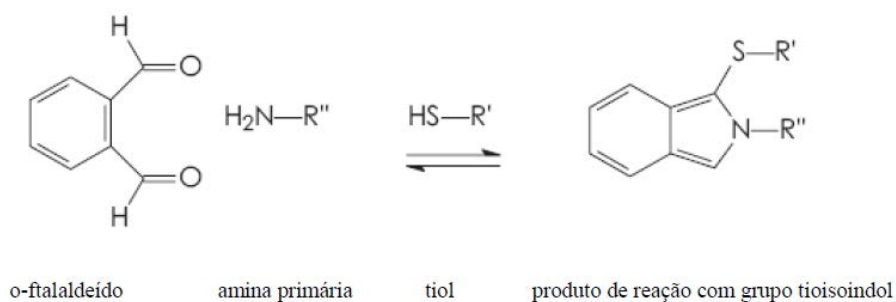
Tabela 2. Áreas das amostras e padrão conservados em ambiente adequado e expostos ao ambiente.

Identificação dos picos	Padrão conservado	Padrão exposto	Amostra conservada	Amostra exposta
C1	839847	649197	370580	283152
C1a	651582	504258	368436	170590
C2a			67820	55829
C2	777353	613609	327375	179981

4.1.3 - Derivação

A derivação é necessária pois sem ela a gentamicina não é visível no UV-VIS, pois em sua estrutura não há grupos cromóforos, pois é constituída aminoaçúcares, além de possuírem um grande número de amins e hidroxilas como radicais. O reagente utilizado para derivação é o *o*-ftalaldeído, o OPA, na presença de ácido tioglicólico, conhecido também como ácido mercaptoacético que possui tiol na sua estrutura (ANDRADE,2015).

O OPA irá reagir com as amins primárias presentes na gentamicina, que são duas, enquanto o ácido mercaptoacético ajuda a estabilizar o derivado. O tamanho da cadeia do tiol afeta diretamente a estabilidade do produto, sendo que quanto maior e mais ramificada melhor é a estabilidade devido ao impedimento estérico, por isso o ácido mercaptoacético é utilizado.



De acordo com a metodologia utilizada, o processo de derivação deve ser conduzido a 60°C por 15 minutos, para verificar se as condições de derivação são suficientes, testes variando o tempo de derivação foram realizados. Os tempos testados foram 15 minutos, 30 minutos e 45 minutos em banho maria a 60°C.

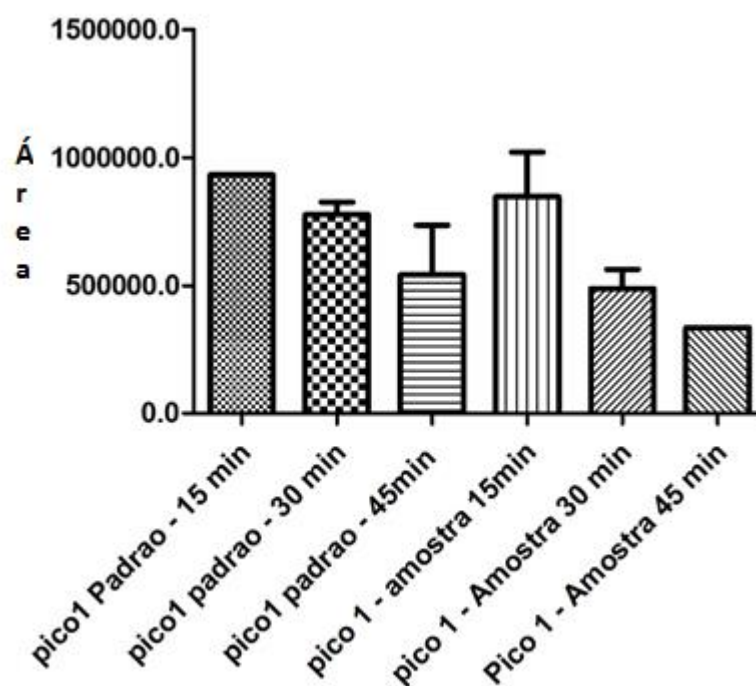


Gráfico 2. Média e desvio padrão das áreas da gentamicina C1 em solução padrão e solução amostra, obtidos em diferentes tempos de derivação.

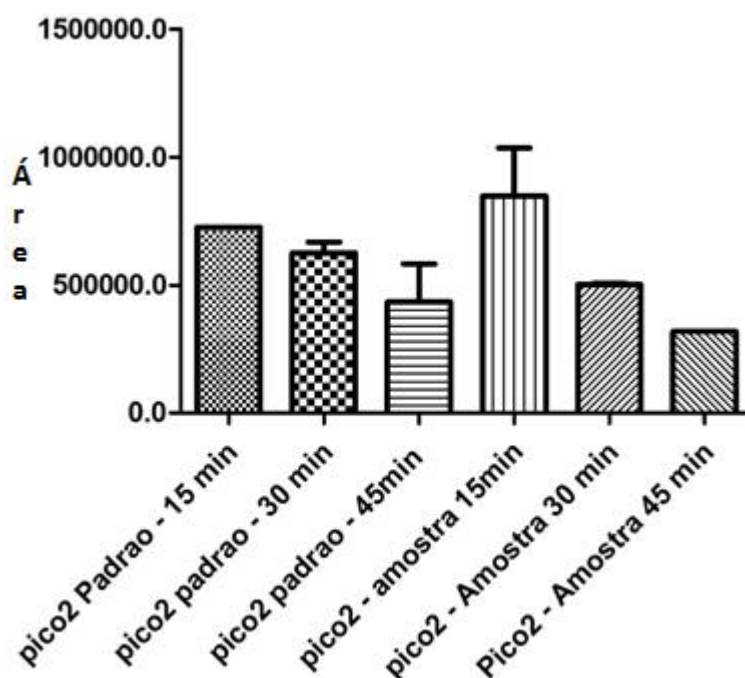


Gráfico 3. Média e desvio padrão das áreas da gentamicina C1a em solução padrão e solução amostra, obtidos em diferentes tempos de derivação.

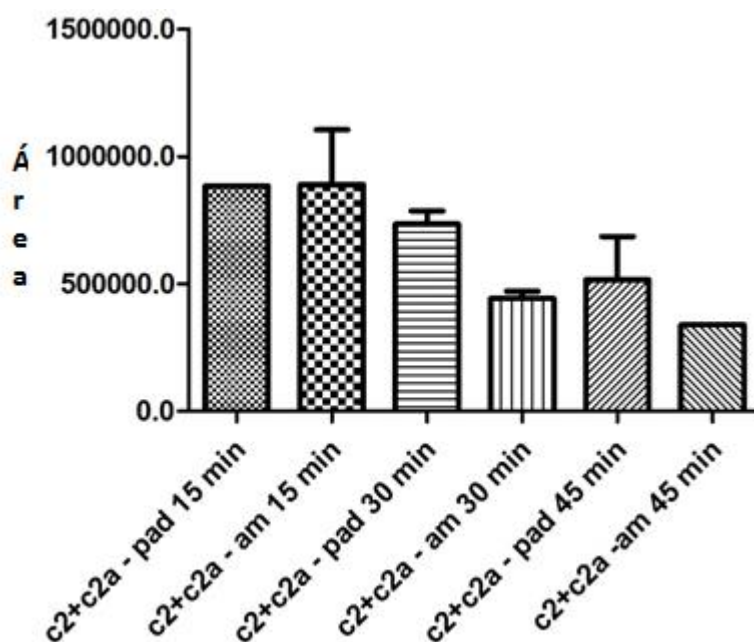


Gráfico 4. Média e desvio padrão das áreas da gentamicina C2 e C2a somadas, obtidos em solução padrão e solução amostra em diferentes tempos de derivação.

Os resultados obtidos mostram que quanto maior o tempo a amostra e o padrão ficaram expostos ao calor menor foram as áreas obtidas, mostrando que aumentar o tempo de derivação só prejudica a análise. Os Gráficos 1, 2 e 3 mostram uma

comparação para cada componente da gentamicina, e em todos os componentes o comportamento foi o mesmo.

4.2 – Validação do método segundo RDC166, de 2017.

4.2.1 – Exatidão

A exatidão deve ser verificada a partir de 9 determinações, sendo necessário apenas 3 concentrações: baixa, média e alta. No caso de matéria prima a exatidão deve ser realizada a partir da solução padrão e devem ser preparadas de forma independente, mas podendo ser diluída a partir de uma solução mãe.

Deve ser calculado o desvio padrão relativo, e a exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação podendo ser determinada pela concentração experimentalmente e a concentração teórica, conforme cálculo a seguir:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração obtida pela amostra}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Para a exatidão da gentamicina as concentrações empregadas foram de 80%, 100%, e 120%. A seguir estão os dados obtidos nas análises e o cálculo da recuperação e do desvio padrão relativo conforme exigidos. Lembrando que considera-se 100% a concentração utilizada no método, que é de 0,360 mg/mL, logo a concentração do solução a 80% é de 0,288 mg/mL e a concentração da solução 120% é 0,432 mg/mL. Os Cromatogramas encontram-se no ANEXO II.

Tabela 3. Padrões de Gentamicina 100%, valor da média utilizada para o cálculo da Exatidão.

Padrão	Concentração (Área)
1	17110998
2	17238897
3	17262187
Média	17204027

Tabela 4. Contém a soma das áreas de cada pico de interesse presente na amostra, cálculo da concentração e recuperação para avaliar a Exatidão.

	Réplicas	Concentração teórica	Área	Concentração obtida	Recuperação	Médias	Desvio padrão relativo (%CV)
Baixo	1	80,00%	14156982	82,29%	82,29%	81,92%	0,32%
	2	80,00%	14068969	81,78%	81,78%		
	3	80,00%	14056031	81,70%	81,70%		
Médio	1	100,00%	17110998	99,46%	99,46%	100,00%	0,47%
	2	100,00%	17238897	100,20%	100,20%		
	3	100,00%	17262187	100,34%	100,34%		
Alto	1	120,00%	21293636	123,77%	123,77%	123,30%	0,48%
	2	120,00%	21215710	123,32%	123,32%		
	3	120,00%	21130230	122,82%	122,82%		

Para comprovar que não há diferença significativa entre as médias das concentrações reais e teóricas, a um nível de significância de 95%, aplicou-se o Teste -t, que como é possível observar na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5. Cálculos do Teste-t para a Exatidão.

	Concentração obtida	Concentração teórica
Média	1,017420947	1
Variância	0,032291755	0,03
Observações	9	9
Variância agrupada	0,031145878	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	16	
Stat t	0,209400505	
P(T<=t) uni-caudal	0,418389262	
t crítico uni-caudal	1,745883676	
P(T<=t) bi-caudal	0,836778523	
t crítico bi-caudal	2,119905299	

t calculado= -0,2094

t crítico bi-caudal= 2,1199

4.2.2 – Precisão

A precisão é dividida em dois testes a repetibilidade e a precisão intermediária.

Os Cromatogramas da precisão encontram-se no Anexo I.

Repetibilidade

A repetibilidade tem como objetivo avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista, e mesma instrumentação e deve obter respostas próximas e com um desvio padrão baixo devendo ser menor que 2%, de acordo com a RDC166, de 2017.

Tabela 6. Áreas obtidas no teste de Repetibilidade e cálculo do teor desvio padrão e desvio padrão relativo.

Amostra	Concentração (Área)	Concentração (%)
1	11859372	64,0393%
2	11859138	64,0380%
3	11835300	63,9093%
4	11834222	63,9035%
5	12003254	64,8162%
6	11818227	63,8171%
Média	11868252	64,0872%
Desvio padrão		0,3673%
Desvio padrão relativo		0,573128561
Padrão		18518898

Como é possível observar na tabela 6 o desvio padrão e o desvio padrão relativo foram bem baixos, mostrando que a metodologia confere repetibilidade nas análises.

Previsão intermediária

A precisão intermediária deve ser demonstrada através da dispersão dos resultados, calculando o desvio padrão e desvio padrão relativo. As análises são realizadas por dois analistas em dois dias diferentes, neste caso o Teste-t ajuda na comparação das médias das amostras preparadas pelos dois analistas, a um nível de significância de 95%.

O Teste-t, na análise do primeiro dia entre as duas analistas, nos mostra que a variação permitida é de 2,2281, e a variação obtida é de 1,7903, e na análise do 2 dia de entre analistas o valor permitido é de 2,3060 e o valor obtido é de 1,7371. E por fim na análise entre os dias, a variação permitida é de 2,0739, e a variação obtida é de - 2,9361. Tanto entre analistas quanto entre os dias, observa-se através do Teste-t que não há diferença significativa entre as médias.

Tabela 7. Valores de área total do primeiro dia da precisão intermediária entre duas analistas, e cálculo de concentração, média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Primeiro dia – Análise entre analistas					
Analista 1: Evelyn			Analista 2: Giovana		
Amostra	Concentração (Área)	Concentração (%)	Amostra	Concentração (Área)	Concentração (%)
1	11369267	81,4285%	1	11180052	80,4754%
2	11051748	79,1544%	2	11003289	79,2031%
3	11169210	79,9957%	3	11012913	79,2724%
4	11110445	79,5748%	4	10986628	79,0831%
5	11110241	79,5733%	5	11012251	79,2676%
6	11009012	78,8483%	6	10979288	79,0303%
Média	11136654	79,7625%	Média	11029070	79,3887%
Desvio padrão relativo		0,9063%	Desvio padrão relativo		0,5414%
Desvio padrão		1,136197631	Desvio padrão		0,681937201
Padrão		13962271	Padrão		13892502

Tabela 8. Cálculos do Teste-t para precisão intermediária primeiro dia entre analistas.

	Concentração (Área)	Concentração (Área)
Média	11136653,83	11029070,17
Variância	16010953631	5656744517
Observações	6	6
Variância agrupada	10833849074	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	1,790257817	
P(T<=t) uni-caudal	0,051841778	
t crítico uni-caudal	1,812461123	
P(T<=t) bi-caudal	0,103683557	
t crítico bi-caudal	2,228138852	
t calculado=	1,7903	
t crítico bi-caudal=	2,2281	
t calculado < t crítico, ou seja aceita Ho.		

Tabela 9. Valores de área total do segundo dia da precisão intermediária entre duas analistas, e cálculo de concentração, média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Segundo dia – Análise entre analistas					
Analista 1: Evelyn			Analista 2: Giovana		
Amostra	Concentração (Área)	Concentração (%)	Amostra	Concentração (Área)	Concentração (%)
1	11121257	78,7089%	1	11274403	80,4685%
2	11175437	79,0923%	2	11297260	80,6316%
3	11314464	80,0763%	3	11238964	80,2156%
4	11132867	78,7910%	4	11268935	80,4295%
5	11196915	79,2443%	5	11290361	80,5824%
6	10995319	77,8176%	6	11195972	79,9087%
Média	11156043	78,9551%	Média	11260983	80,3727%
Desvio padrão relativo		0,7404%	Desvio padrão relativo		0,2696%
Desvio padrão		0,937758013	Desvio padrão		0,335425188
Padrão		14129609	Padrão		14010953

Tabela 10. Cálculos do Teste-t para precisão intermediária segundo dia entre analistas.

	11274403	11121257
Média	11258298,4	11163000,4
Variância	1729388253	13317791235
Observações	6	6
Variância agrupada	7523589744	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	1,737165668	
P(T<=t) uni-caudal	0,060281272	
t crítico uni-caudal	1,859548038	
P(T<=t) bi-caudal	0,120562544	
t crítico bi-caudal	2,306004135	
t calculado= 1,7372		
t crítico bi-caudal= 2,3060		
T calculado < t crítico, ou seja, aceita-se Ho.		

Tabela 11. Valores de área total do da precisão intermediária entre os dois dias, e cálculo de concentração, média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Primeiro dia			Segundo dia		
Amostr a	Concentração (Área)	Concentraçã o (%)	Amostr a	Concentraçã o (Área)	Concentraçã o (%)
1	11369267	81,4285%	1	11121257	78,7089%
2	11051748	79,1544%	2	11175437	79,0923%
3	11169210	79,9957%	3	11314464	80,0763%
4	11110445	79,5748%	4	11132867	78,7910%
5	11110241	79,5733%	5	11196915	79,2443%
6	11180052	80,0733%	6	10995319	77,8176%
7	11003289	79,2031%	7	11274403	80,4685%
8	11012913	79,2724%	8	11297260	80,6316%
9	10986628	79,0831%	9	11238964	80,2156%
10	11012251	79,2676%	10	11268935	80,4295%
11	10979288	79,0303%	11	11290361	80,5824%
12	11029070	79,3887%	12	11195972	79,9087%
Médias	11084533,51	79,5871%	Médias	1128512,83	79,6639%
Desvio padrão relativo		0,6697%	Desvio padrão relativo		0,9112%

Tabela 12. Cálculos do Teste-t para precisão intermediária entre os dias.

	Concentração (Área)	Concentração (Área)
Média	11084533,51	11208512,83
Variância	12769767097	8626703059
Observações	12	12
Variância agrupada	10698235078	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	22	
Start t	-2,936086221	
P(T<=t) unit-caudal	0,003822037	
T crítico uni-caudal	1,717144374	
P(T<=t) bi-caudal	0,007644073	
T crítico bicaudal	2,073873068	

T calculado= -2,9361

T crítico bicaudal= 2,0739

t calculado < t crítico, ou seja aceita Ho.

4.2.3 – Seletividade

Para demonstrar a seletividade do método é preciso comprovar que nenhum componente da análise interfere na identificação e quantificação de uma substância de interesse. No caso de método cromatográfico deve ser comprovada a pureza cromatográfica do analito, porém para produtos biológicos, como a gentamicina, isso não é necessário.

A seguir tabela 13 traz informações obtidas na análise da seletividade do método.

Tabela 13. Valores obtidos no teste de Seletividade.

Condição normal			
Condição	Réplica	Concentração (Área)	Resultado (%)
Diluyente/Água	1	0	0
Diluyente/Água	2	0	0
Diluyente/Água	3	0	0
Diluyente/OPA e IPA	1	0	0
Diluyente/OPA e IPA	2	0	0
Diluyente/OPA e IPA	3	0	0
Padrão 100%	1	18274164	100,5424%
Padrão 100%	2	18156787	99,8966%
Padrão 100%	3	18095803	99,5611%
Média dos padrões 100%		18175585	100,0000%
Amostra 100%	1	10647738	58,5826%
Amostra 100%	2	10682796	58,7755%
Amostra 100%	3	10603856	58,3412%
Média das amostras 100%		10644797	58,5665%

5 – Discussão

O teste de Conteúdos de Gentamicina é um teste que não é reconhecido para a determinação de teor da matéria prima, de acordo com a farmacopéia brasileira este teste deve ser conduzido microbiologicamente. Por isso o objetivo desta análise é identificar e quantificar cada componente de gentamicina presente no sal utilizado para preparo do medicamento, e para isso um método mais sensível e seletivo deve ser empregado, justificando assim o uso de métodos cromatográficos.

Como exposto anteriormente o método mais reconhecido, tanto nacionalmente pela ANVISA, como internacionalmente pela USP, para a análise em questão é o método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector amperométrico, porém este é um método que requer um cromatógrafo de íons que possui valor semelhante a um HPLC comum, cerca de 345 mil reais, para a realidade da indústria obter um equipamento com um valor tão elevado para apenas um produto é inviável, além de não fornecer dados muito diferentes que no DAD como é possível verificar na figura 6.

O que nos mostra que o método por cromatografia líquida de alta eficiência, apesar de não muito reconhecido, apresenta resultados satisfatório e semelhantes, além de ser um método possível de validar conforme exigências da ANVISA.

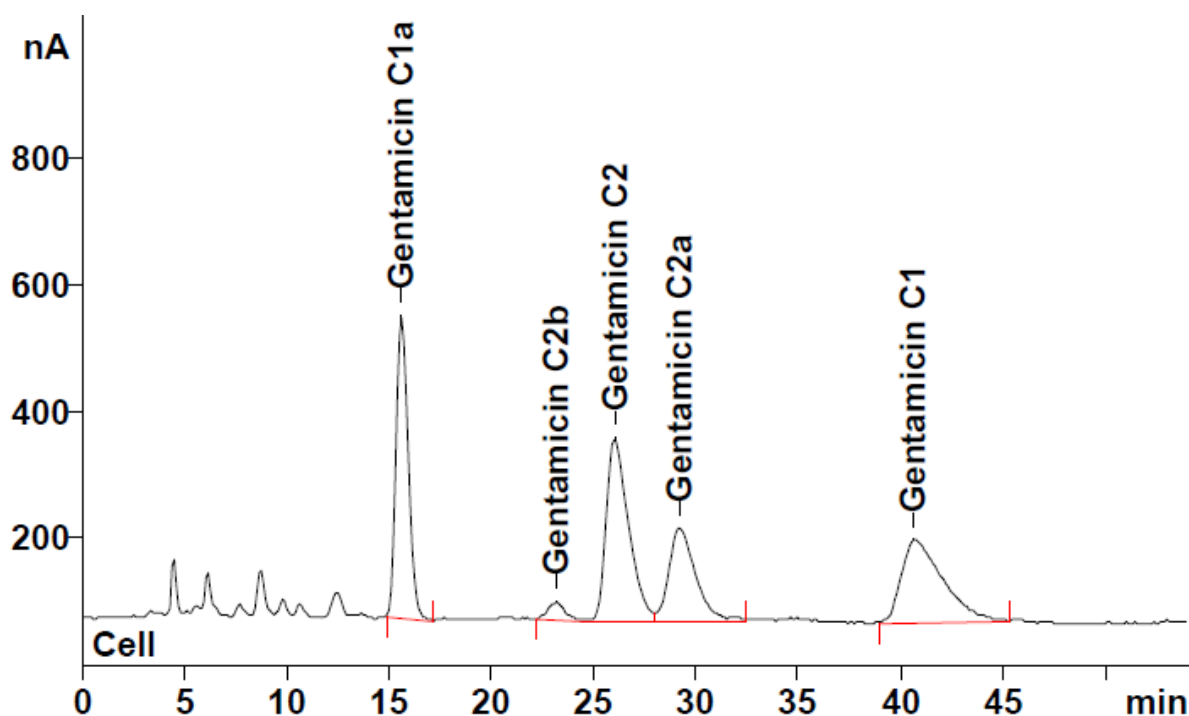


Figura 6. Cromatograma da gentamicina. Análise realizada com um cromatógrafo de íons.

6 – Conclusão

Com base nos resultados apresentados em relação a estabilidade da solução é possível concluir que:

- A amostra deve ficar armazenada de forma correta, em um ambiente seco, com temperatura controlada, sem incidência de luz e bem fechado para não ter contato com a umidade do ar, pois a substância é um sal que absorve água e é fotossensível;
- O tempo de derivação deve ser de exatos 15 minutos, para obter resultados confiáveis;
- A amostra após preparada e derivatizada é estável por apenas de 3 horas.

Com relação a validação do método conclui-se que este é um método confiável seletivo, exato e preciso, tendo apresentado resultados satisfatório na validação do método de acordo com parâmetros descritos na RDC166 de julho de 2017.

Referências

1. ANDRADE, J.R.M. **Avaliação da resposta óptica decorrente da interação entre gentamicina e nanopartículas de ouro esféricas e em forma de bastão visando aplicação analítica**. 2015. 132f. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre – PUC-Rio, Rio de Janeiro 2015.
2. ANVISA, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos – principais grupos disponíveis para uso clínico – Aminoglicosídeos**. 2007. Disponível em: <
http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/aminoglicosideos.htm> Acesso em: 08 de jun. de 2017.
3. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº17, de 16 de abril de 2010**, publicada no D.O.U. de 19 de abril de 2010.
4. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº166, de 24 de julho de 2017**, publicada no D.O.U. nº 141, de 25 de julho de 2017.
5. BRITISH, Pharmacopeia, 2015. London: Her Majesty's Stationery Office, 2015. Monog. 0331.
6. BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S; PARKER, K.L., eds. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. P1039-1042.
7. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**, Campinas, SP, Editora UNICAMP, 2006.

8. Rename 2010/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário terapêutico nacional 2010** – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
9. ISOHERRANEN, N.; SOBACK, S. **Chromatographic methods for analysis of aminoglycoside antibiotics**. *Jornal of AOAC International*, v.82, n.5, p.1017-1045, 1999.
10. LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**, Campinas, SP, Editora Átomo, 2009.
11. SANTOS, L.H.M.L.M. **Análise automática de gentamicina por quimiluminescência**. 2008. 88p. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade) – Faculdade do Porto, Faculdade de Farmácia. Porto 2008.
12. STEAD, D.A. **Curred methodologies for the analysis of aminoglycosides**. *Journal of Chormatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, v.747, n.1/2, p. 69-93, 2000.
13. UNITED, States Pharmacopeia. 36 ed. **Rockville:United States Pharmacopeial Convention**, 2013.
14. UNITED States Pharmacopeia. 38 ed. **Rockville:United States Pharmacopeial Convention**, 2015.
15. UNITED States Pharmacopeia. 39 ed. **Rockville:United States Pharmacopeial Convention**, 2016.
16. Zembower, T. R. et al. **The utility of aminoglycosides in an are of emerging drug resistance**. *International Jornal of Antimicrobial Agents*, v.10, n. 2, p. 95-105, Maio 1998.

ANEXOS

ANEXO I – Cromatograma da validação do método - Precisão

I - Teste de Repetibilidade do método

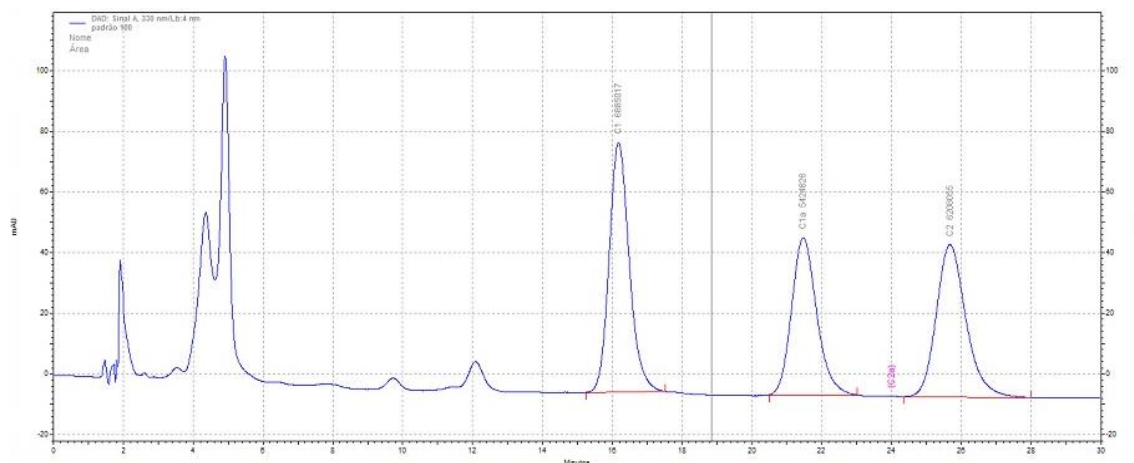


Figura 7. Padrão de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml do teste de Repetibilidade.

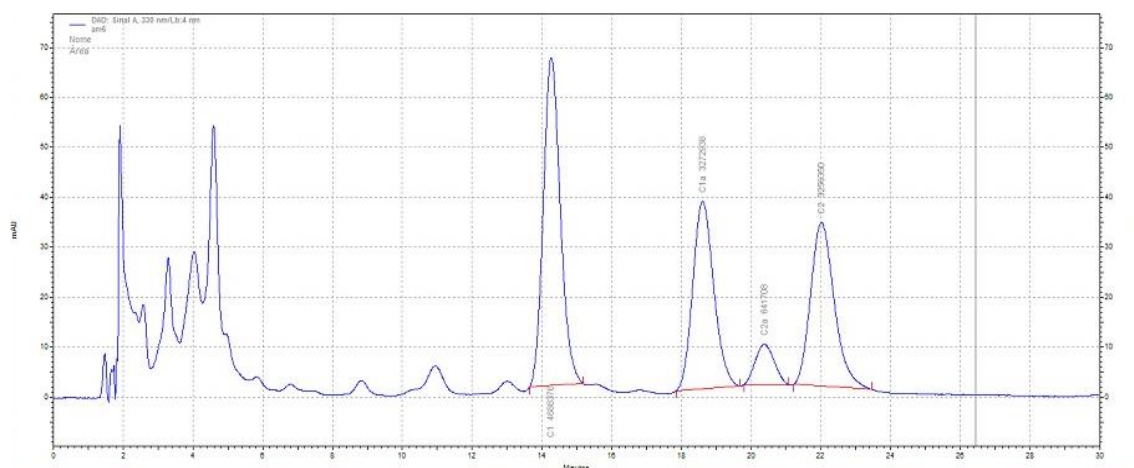


Figura 8. Amostra 1 de sulfato de gentamicina do teste de repetibilidade.

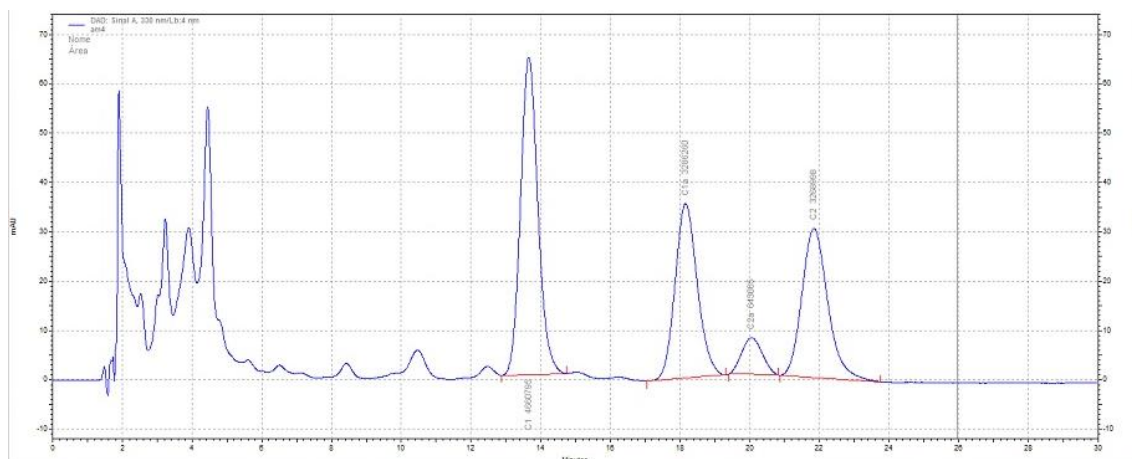


Figura 9. Amostra 2 de sulfato de gentamicina do teste de repetibilidade.

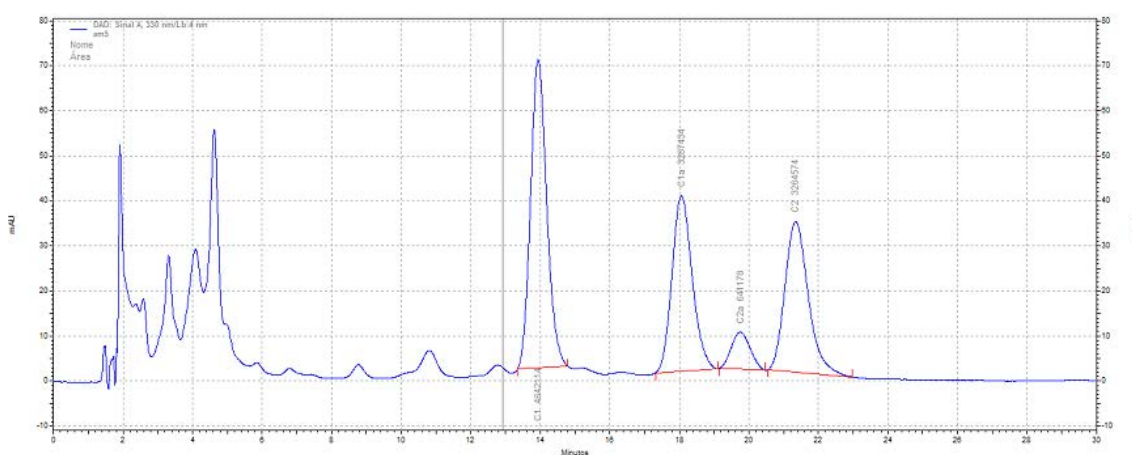


Figura 10. Amostra 3 de sulfato de gentamicina do teste de repetibilidade.

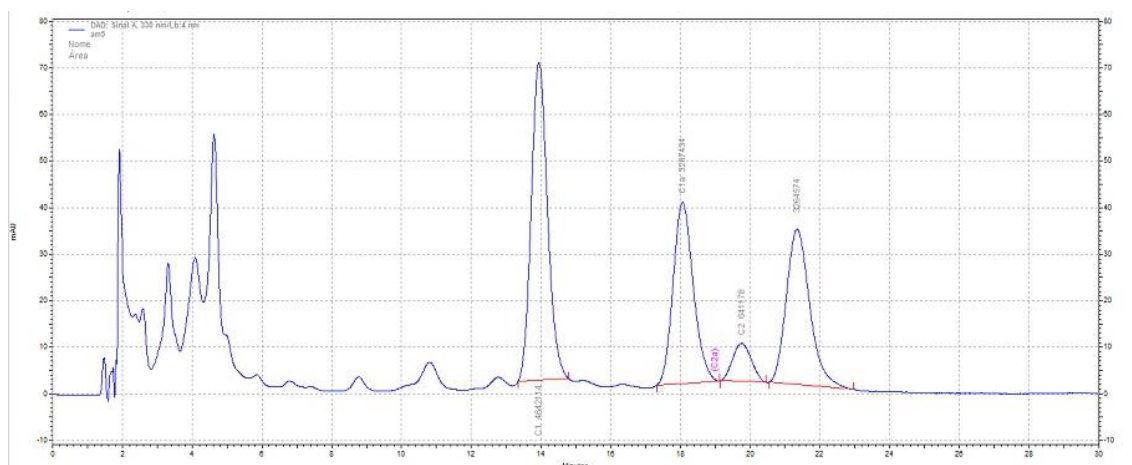


Figura 11. Amostra 4 de sulfato de gentamicina do teste de repetibilidade.

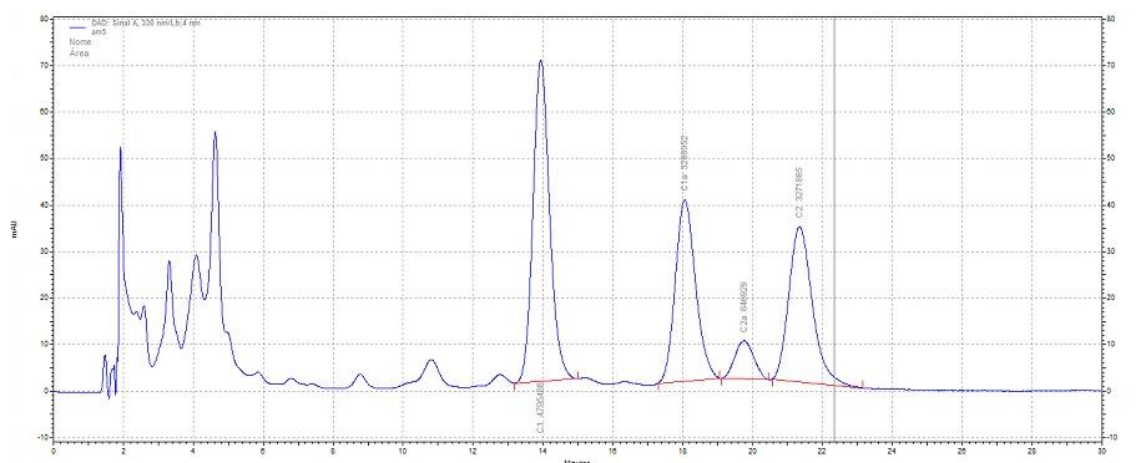


Figura 12. Amostra 5 de sulfato de gentamicina do teste de repetibilidade.

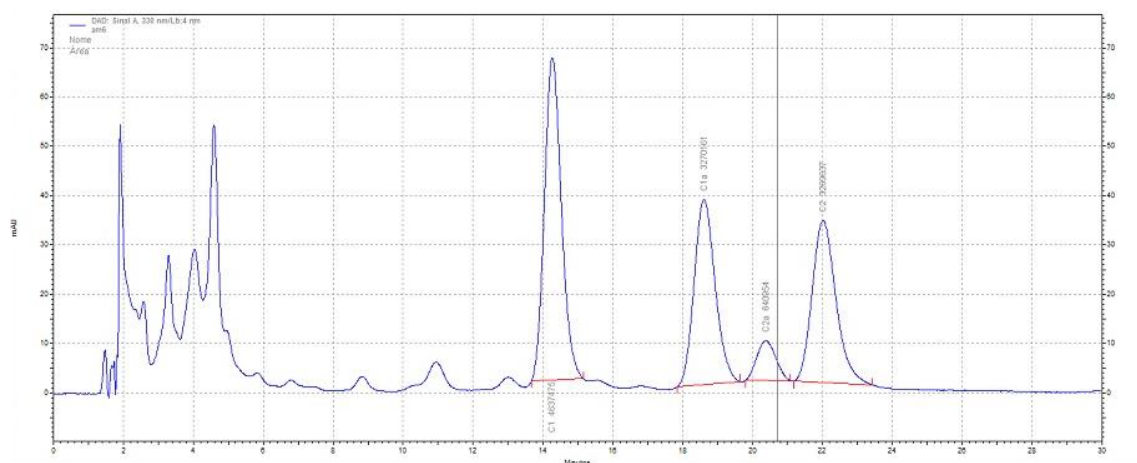


Figura 13. Amostra 6 de sulfato de gentamicina do teste de repetibilidade.

II – Precisão intermediária

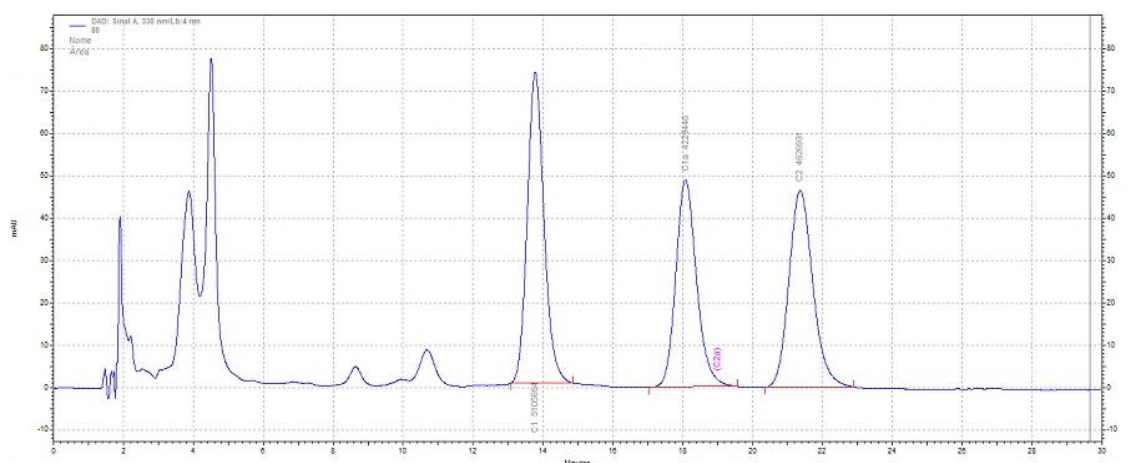


Figura 14. Padrão de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.

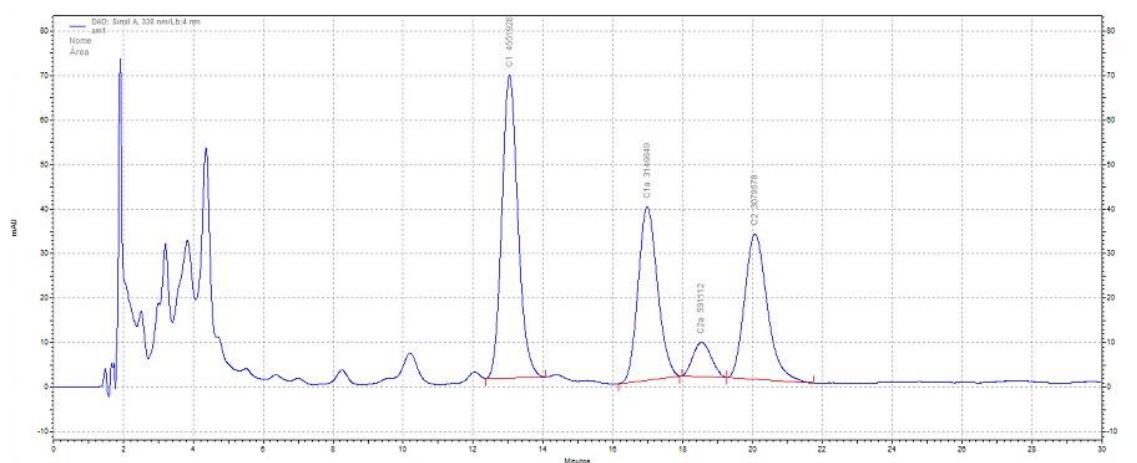


Figura 15. Amostra 1 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.

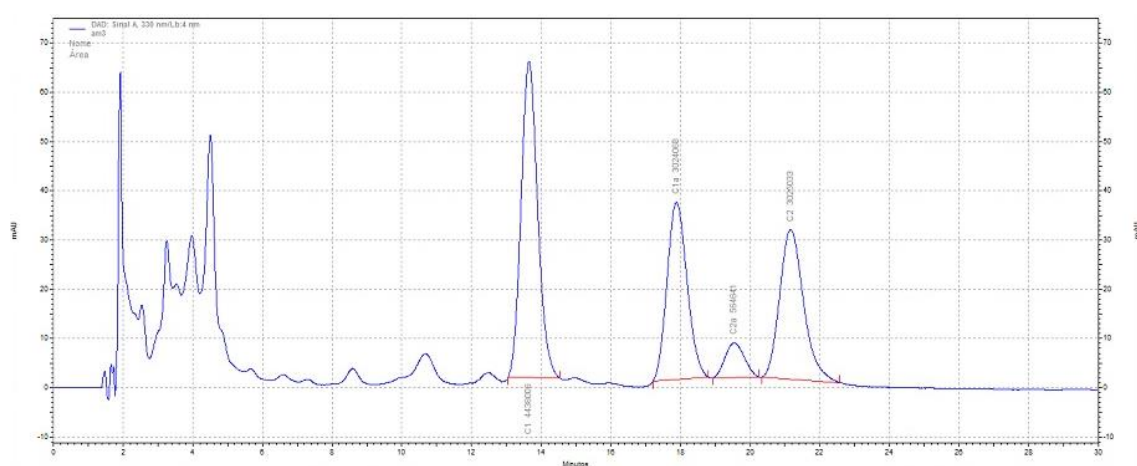


Figura 16. Amostra 2 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn

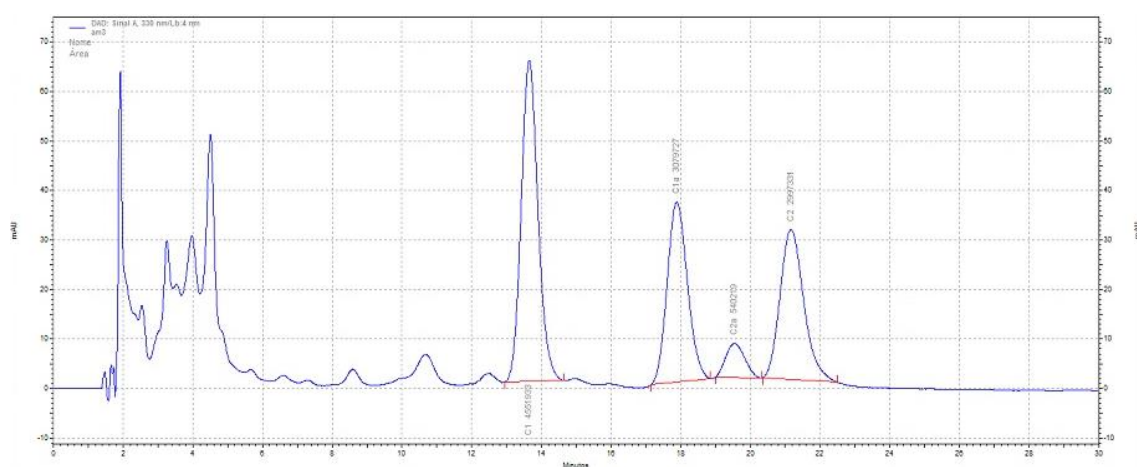


Figura 17. Amostra 3 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn

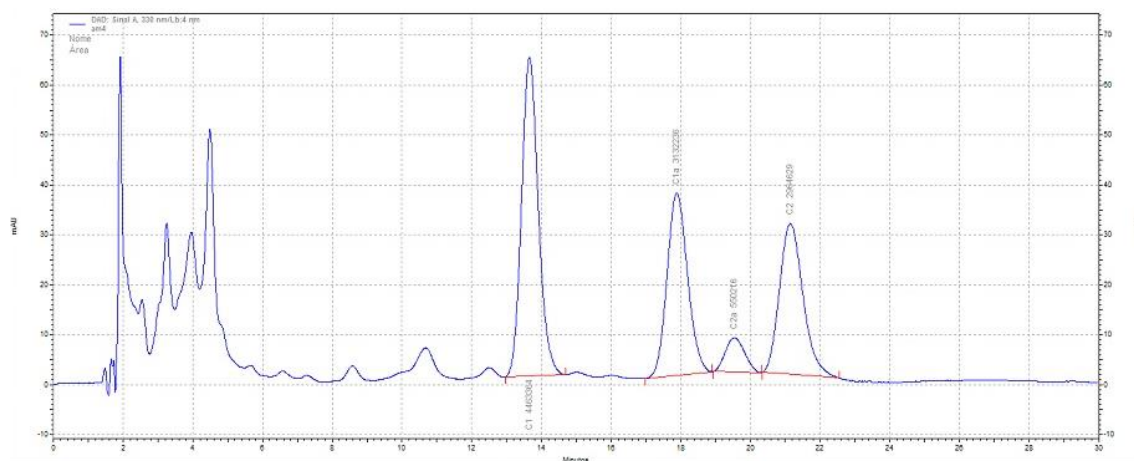


Figura 18. Amostra 4 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn

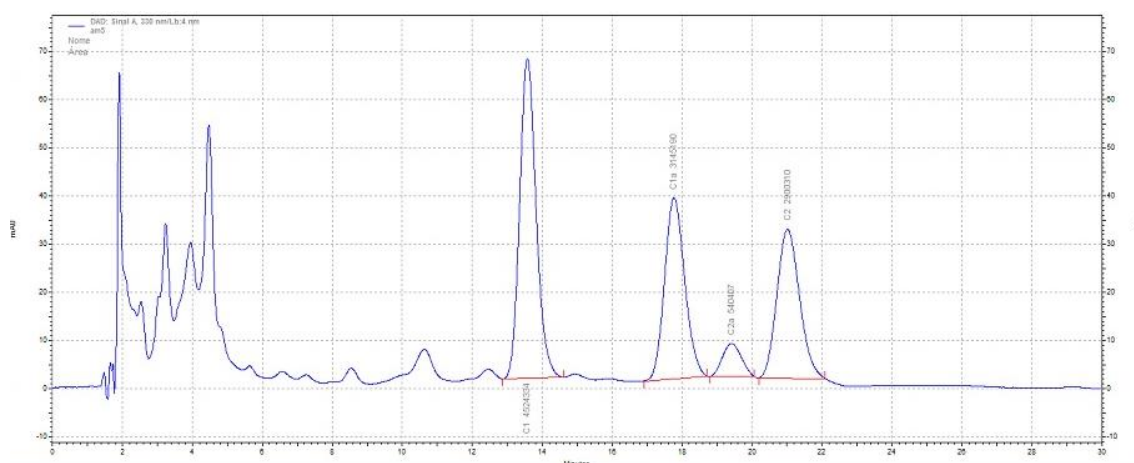


Figura 19. Amostra 5 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn

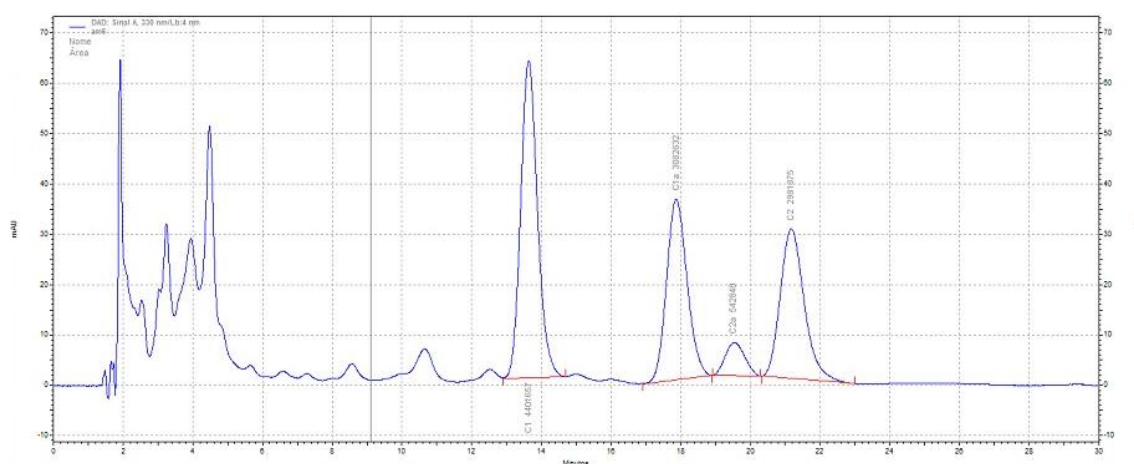


Figura 20. Amostra 6 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn

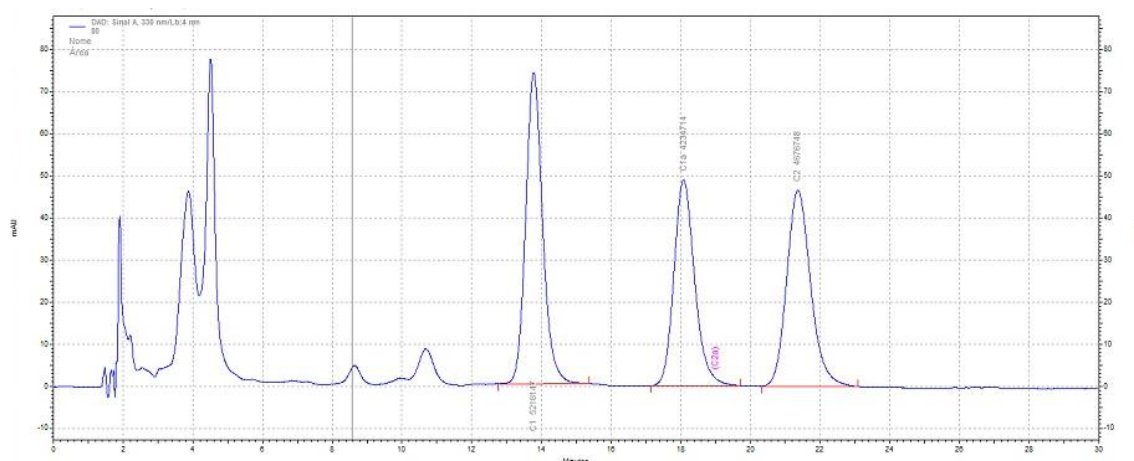


Figura 21. Padrão de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Evelyn.

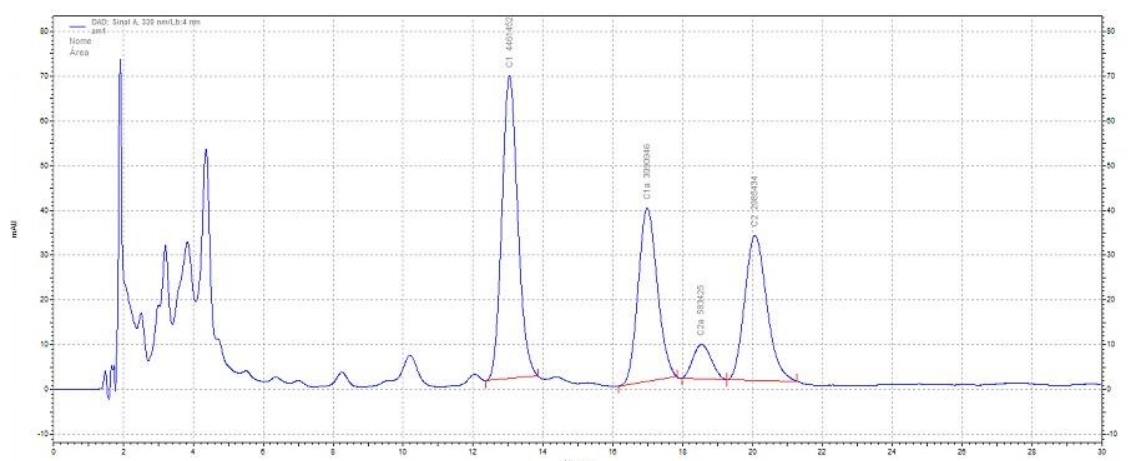


Figura 22. Amostra 1 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.

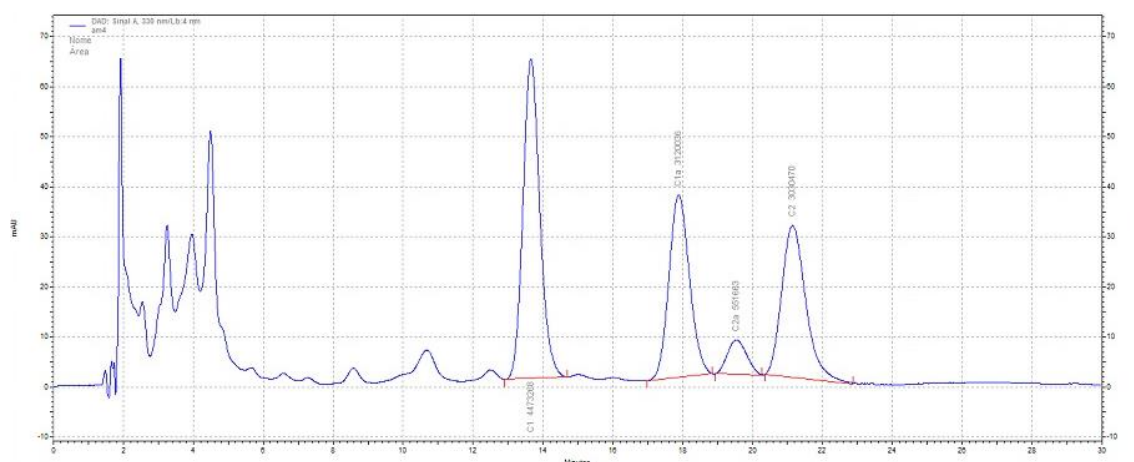


Figura 23. Amostra 2 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.

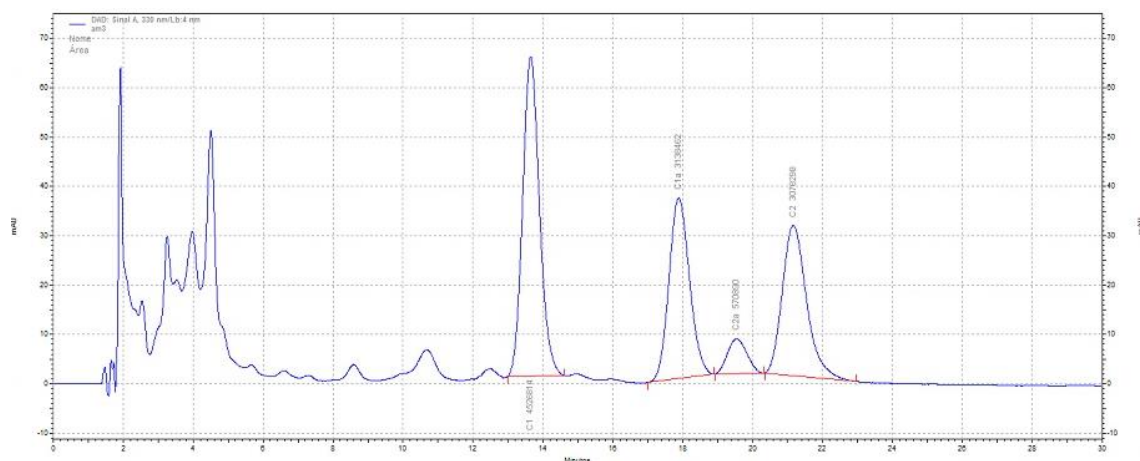


Figura 24. Amostra 3 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.

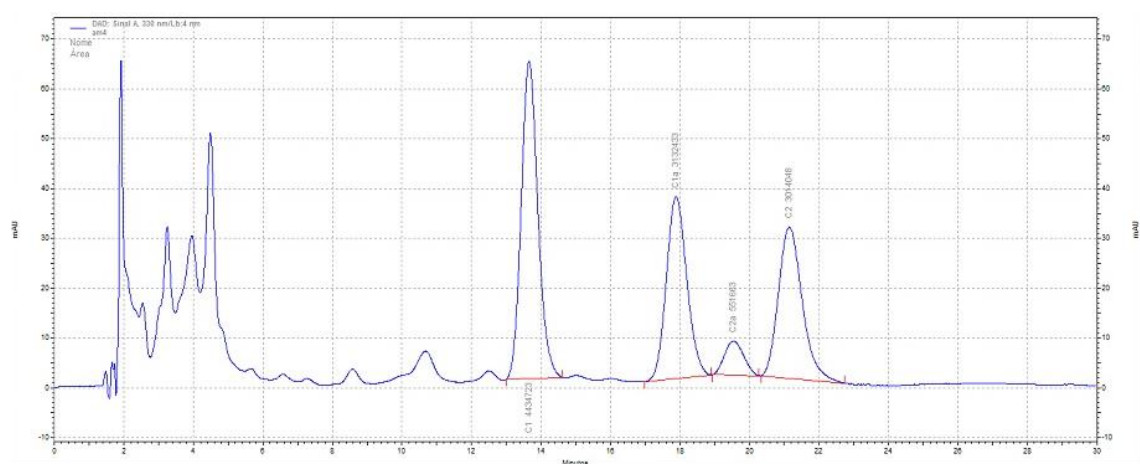


Figura 25. Amostra 4 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.

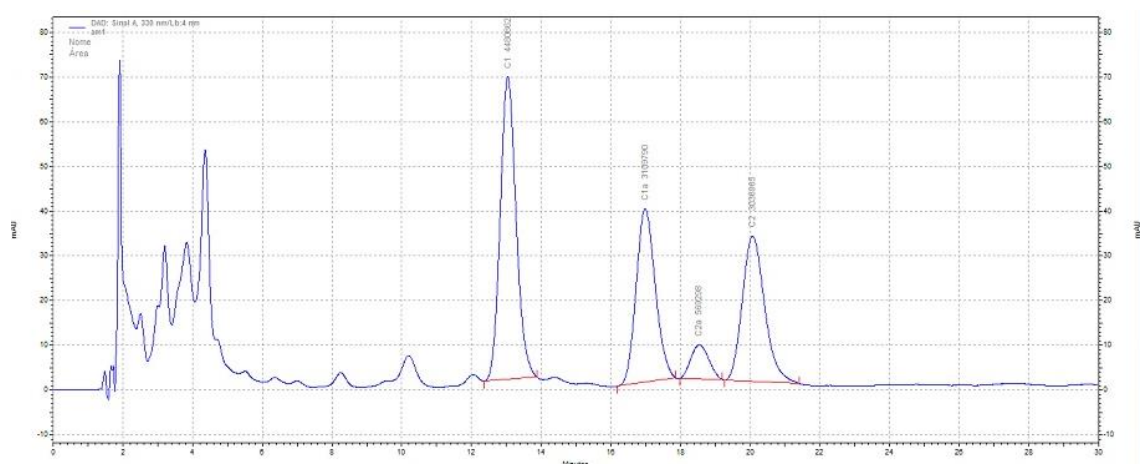


Figura 26. Amostra 5 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.

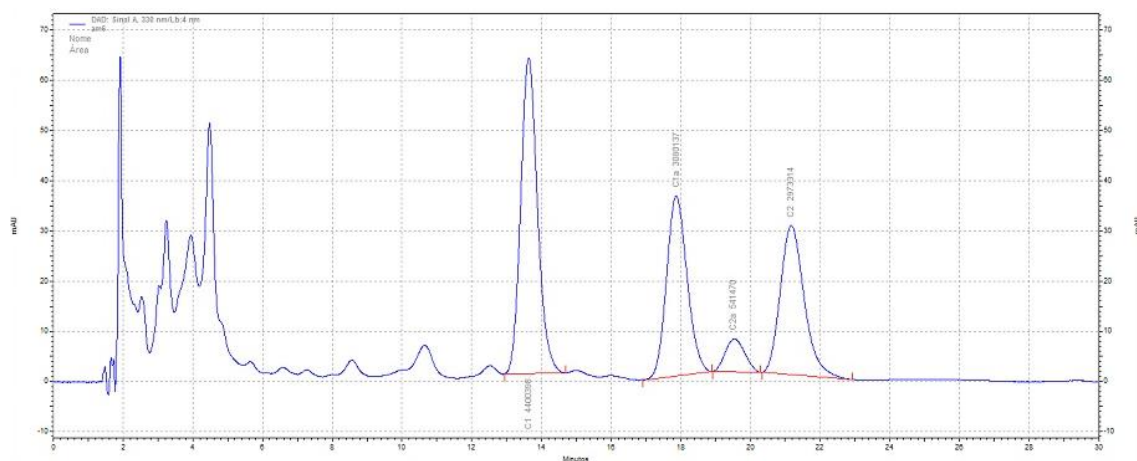


Figura 27. Amostra 6 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Evelyn.

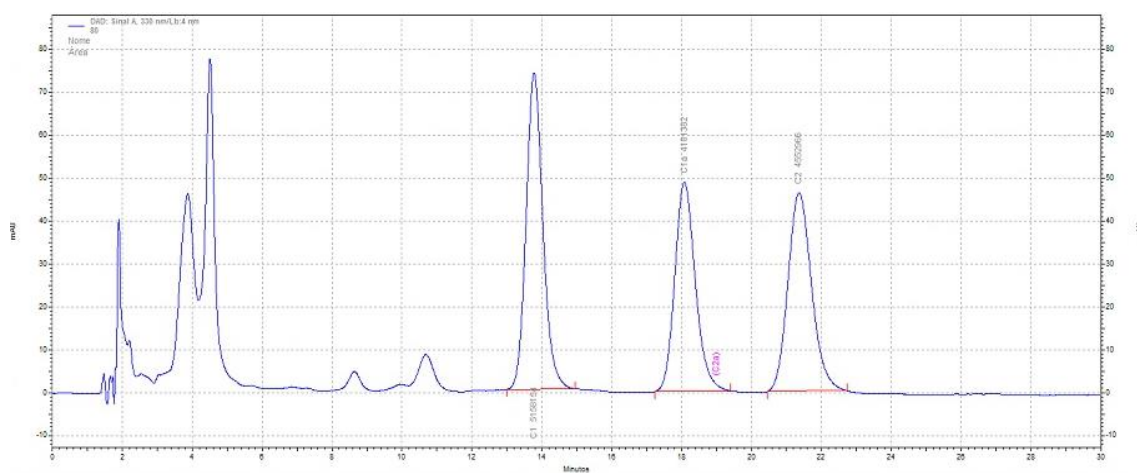


Figura 28. Padrão de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.

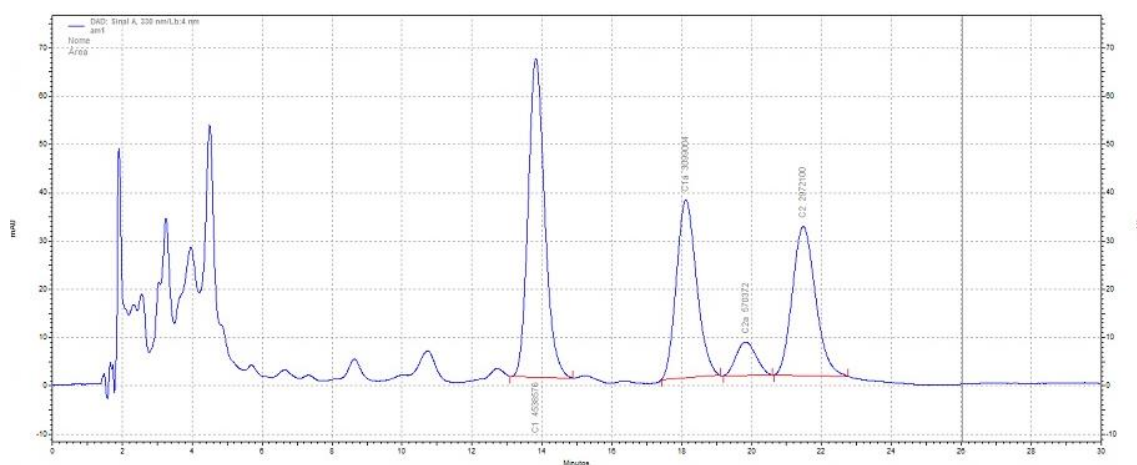


Figura 29. Amostra 1 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.

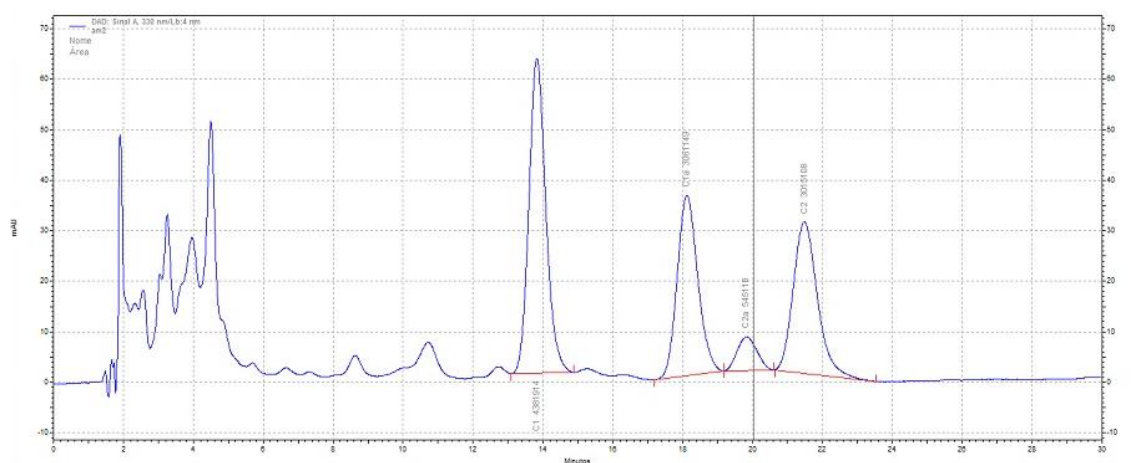


Figura 30. Amostra 2 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.

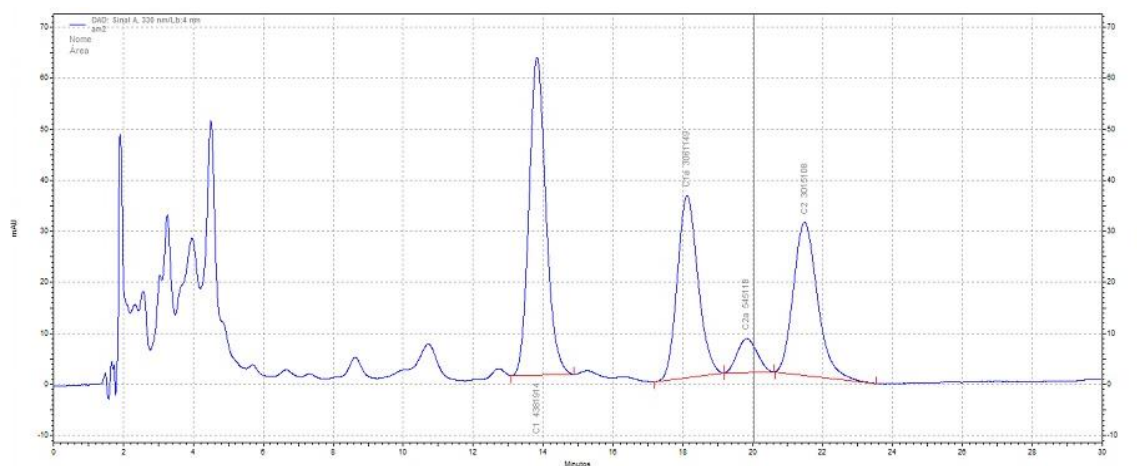


Figura 31. Amostra 3 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.

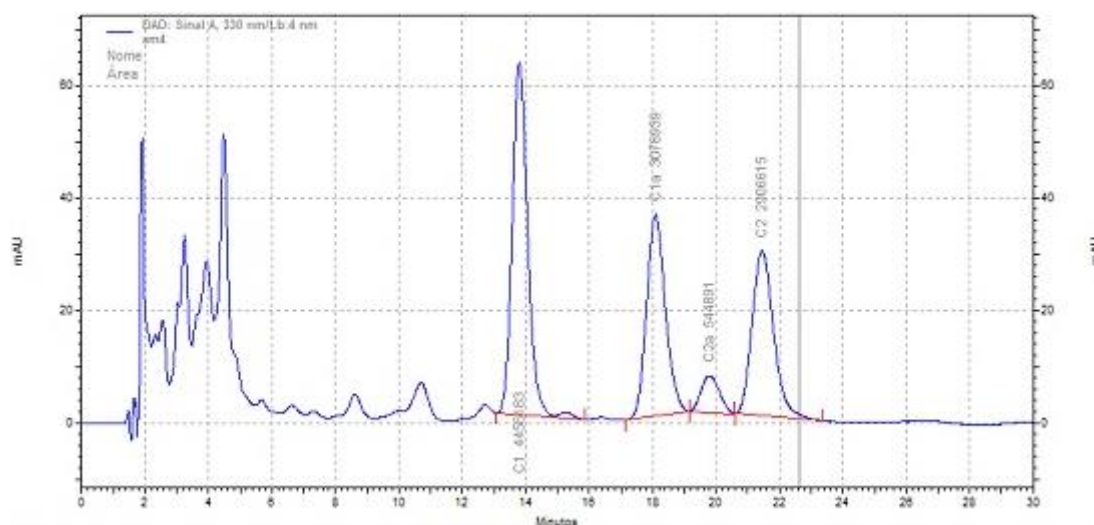


Figura 32. Amostra 4 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.

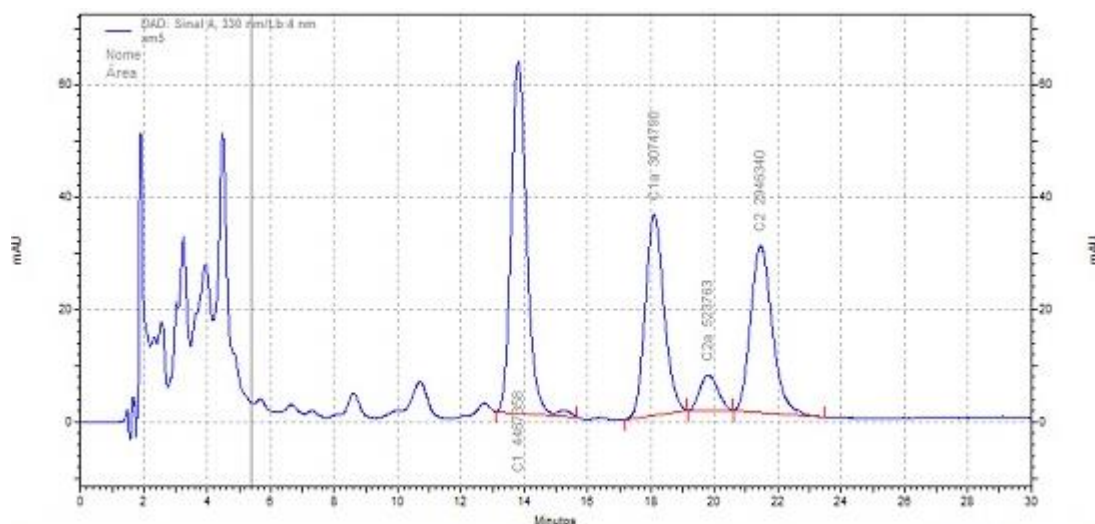


Figura 33. Amostra 5 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.

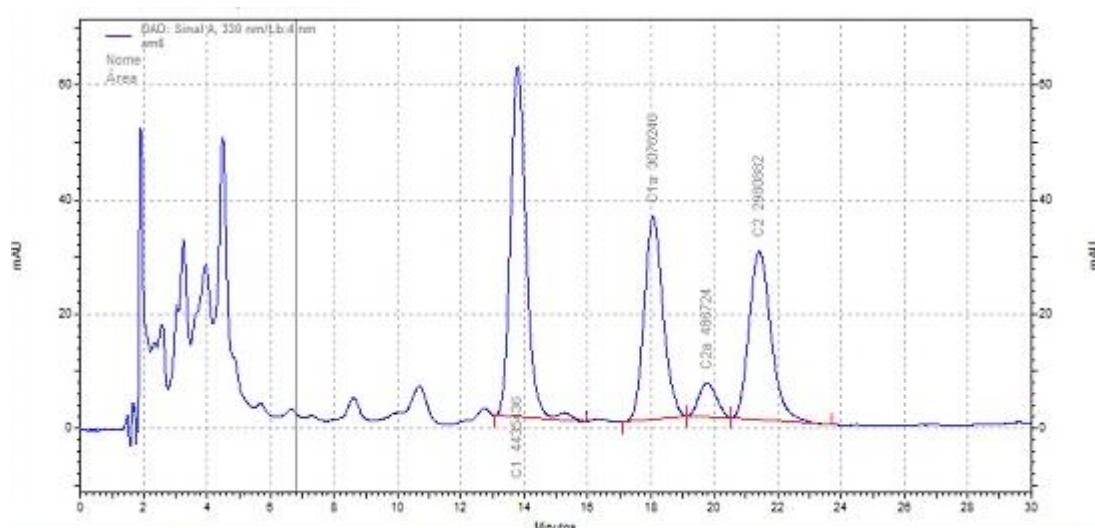


Figura 34. Amostra 6 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária primeiro dia preparado pela analista Giovana.

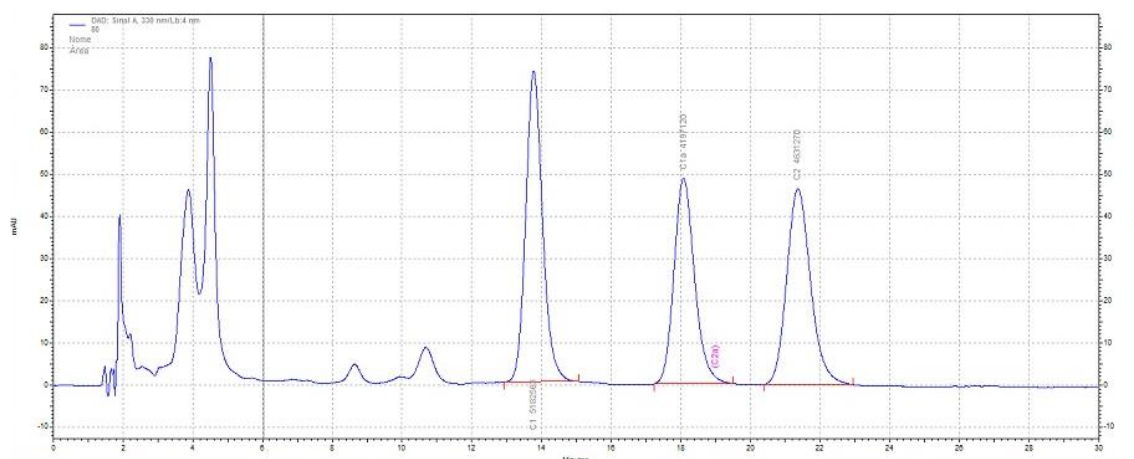


Figura 35. Padrão de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.

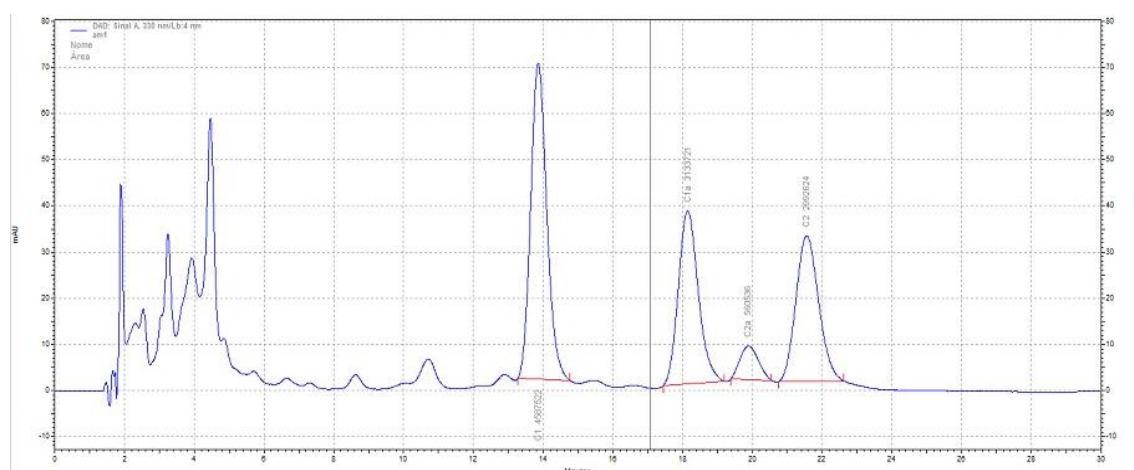


Figura 36. Amostra 1 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.

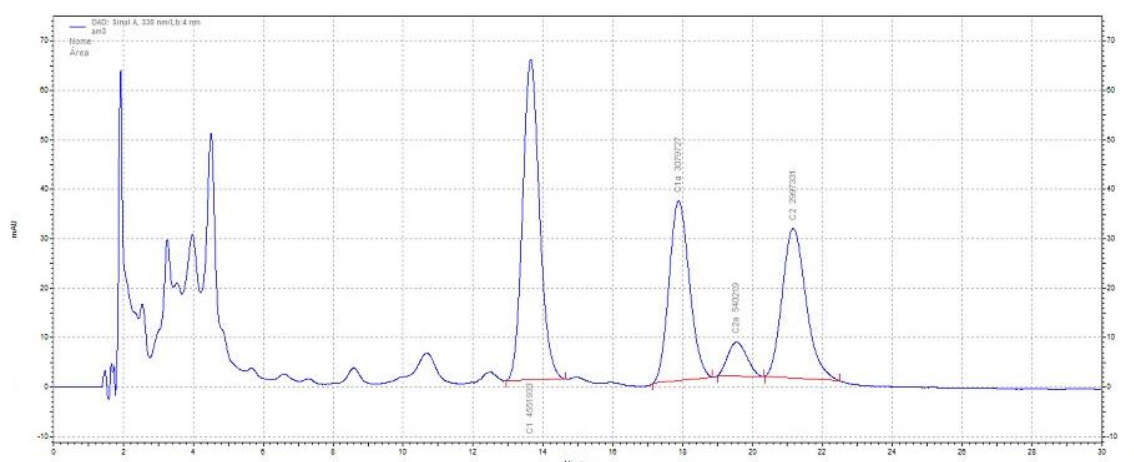


Figura 37. Amostra 2 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.

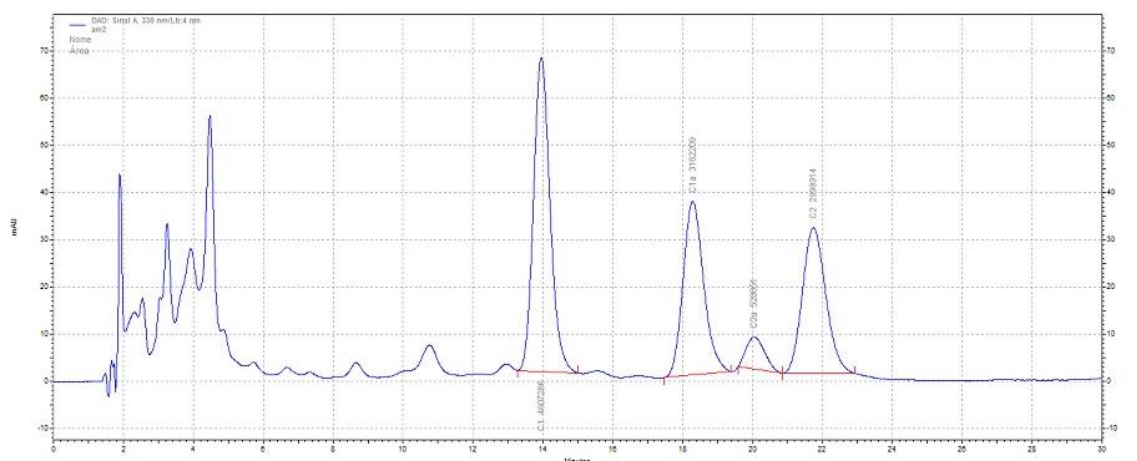


Figura 38. Amostra 3 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.

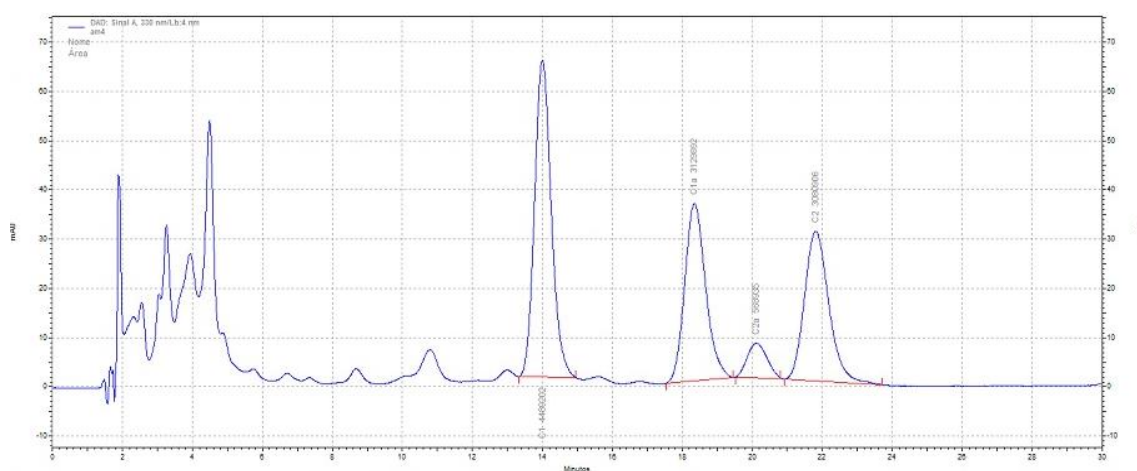


Figura 39. Amostra 4 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.

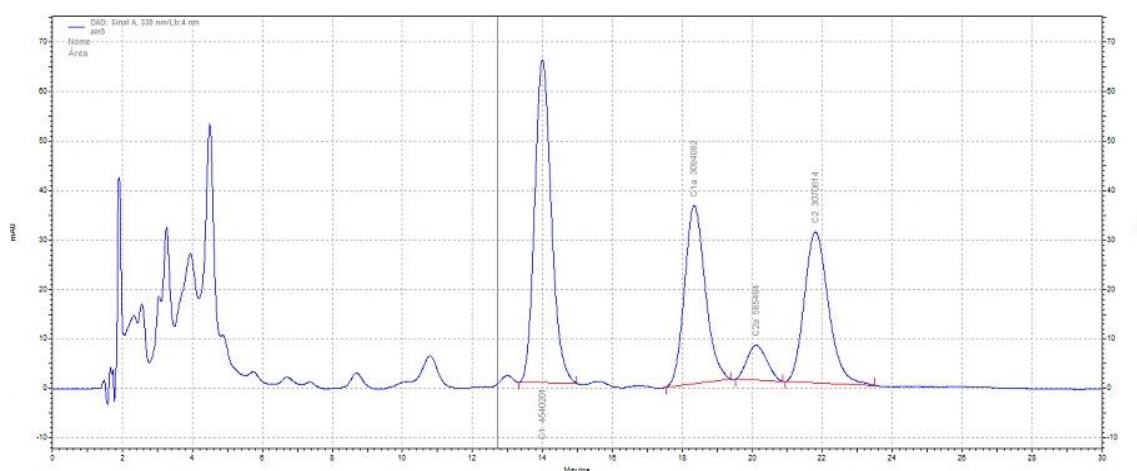


Figura 40. Amostra 5 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.

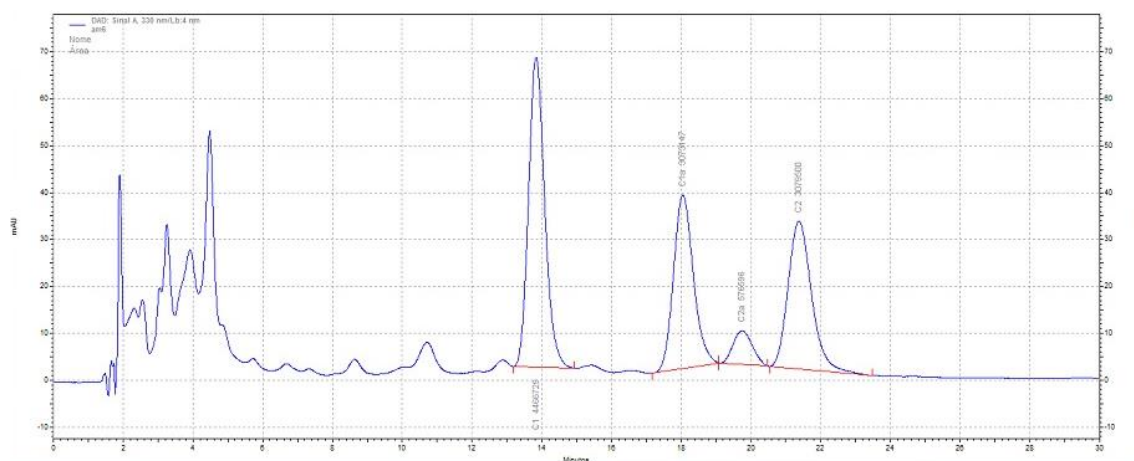


Figura 41. Amostra 6 de Sulfato de Gentamicina à 0,26mg/ml do teste precisão intermediária segundo dia preparado pela analista Giovana.

ANEXO II – Cromatogramas validação do método - Exatidão

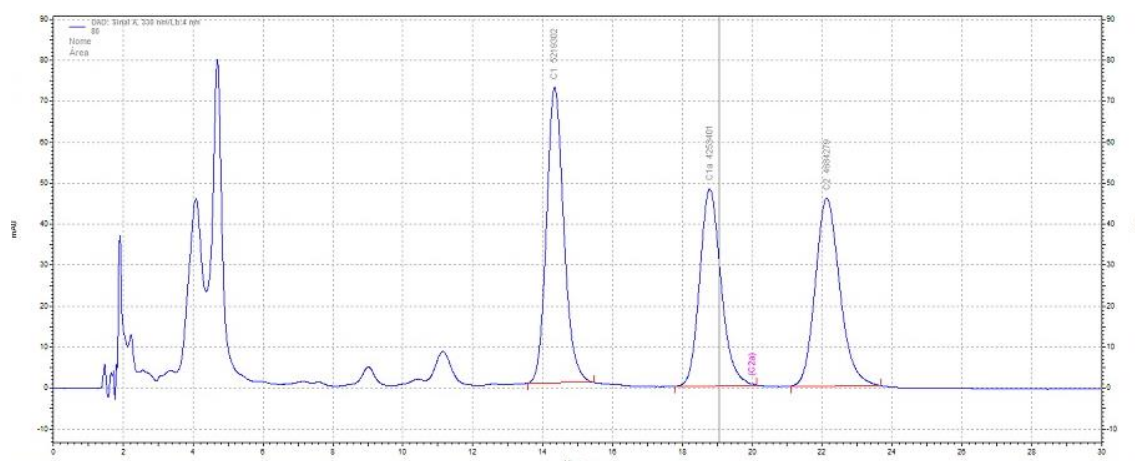


Figura 42. Padrão de Sulfato de gentamicina a 80% replicata 1 do teste de Exatidão.

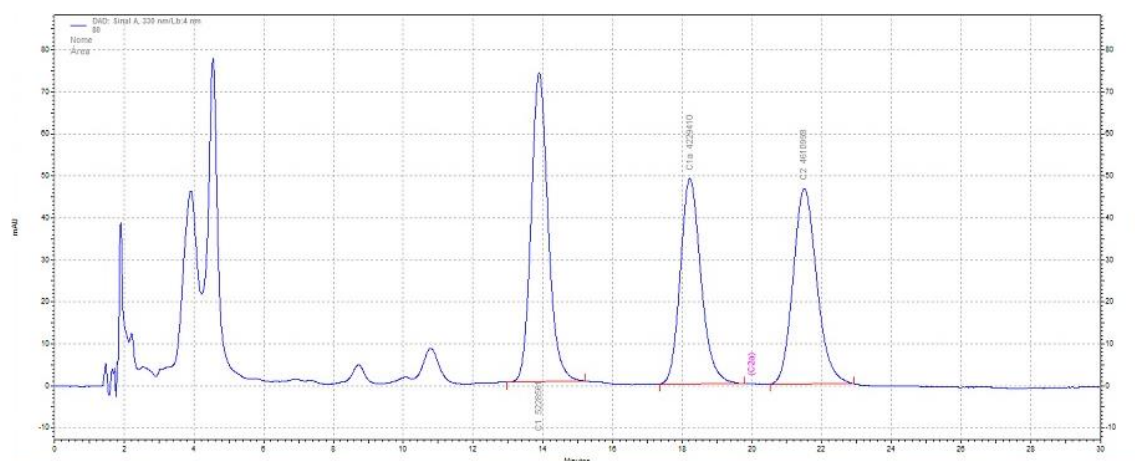


Figura 43. Padrão de Sulfato de gentamicina a 80% replicata 2 do teste de Exatidão.

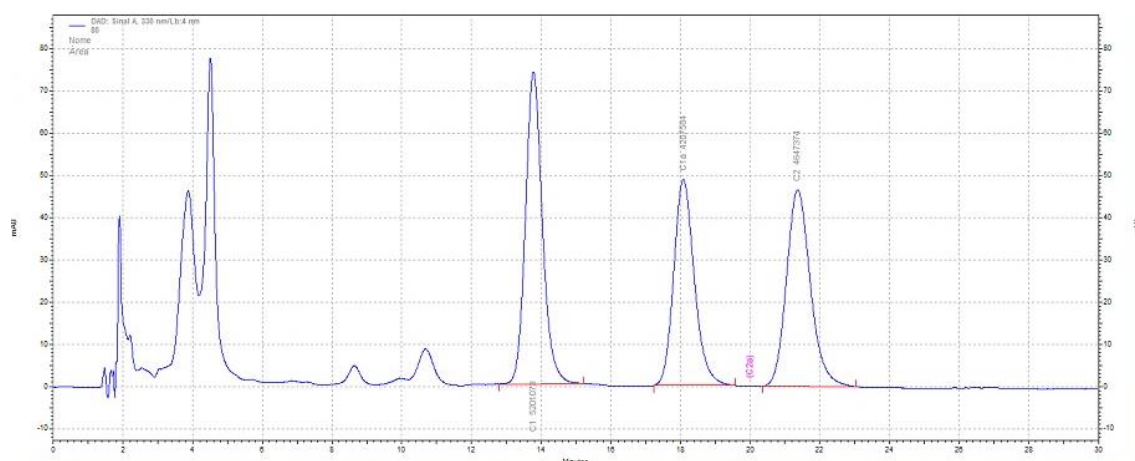


Figura 44. Padrão de Sulfato de gentamicina a 80% replicata 3 do teste de Exatidão.

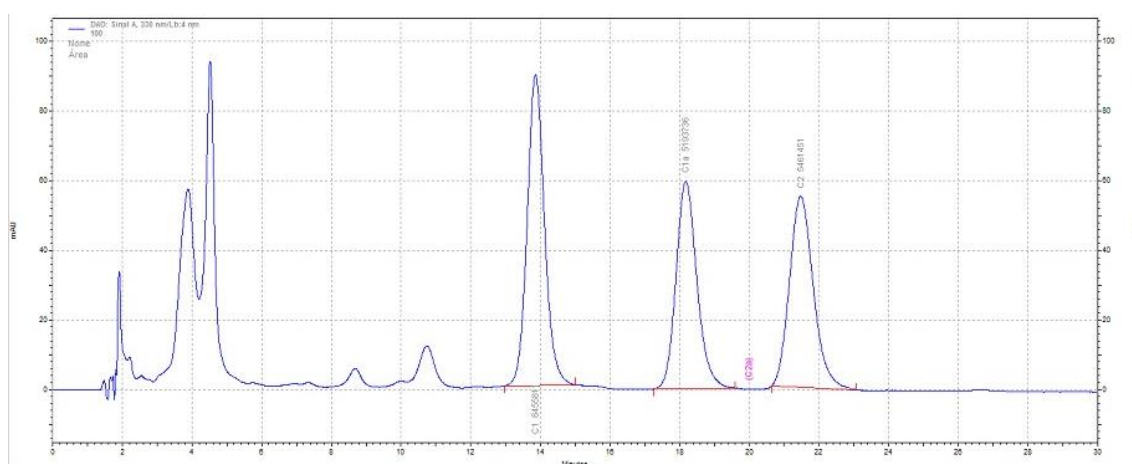


Figura 45. Padrão de Sulfato de gentamicina a 100% replicata 1 do teste de Exatidão.

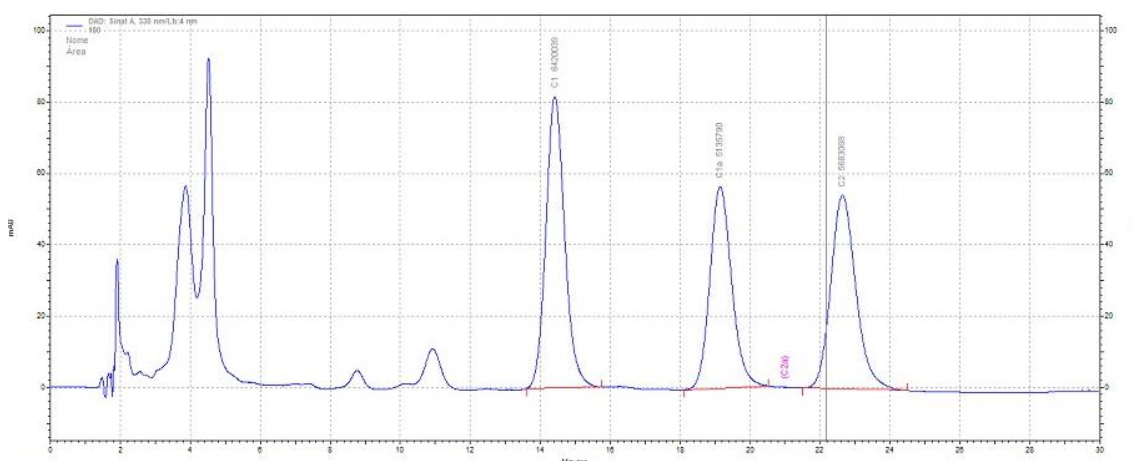


Figura 46. Padrão de Sulfato de gentamicina a 100% replicata 2 do teste de Exatidão.

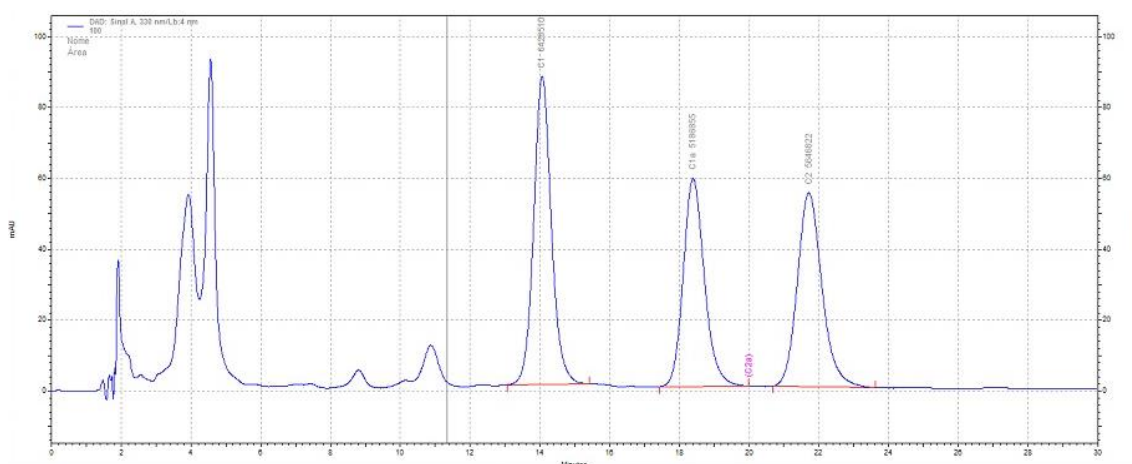


Figura 47. Padrão de Sulfato de gentamicina a 100% replicata 3 do teste de Exatidão.

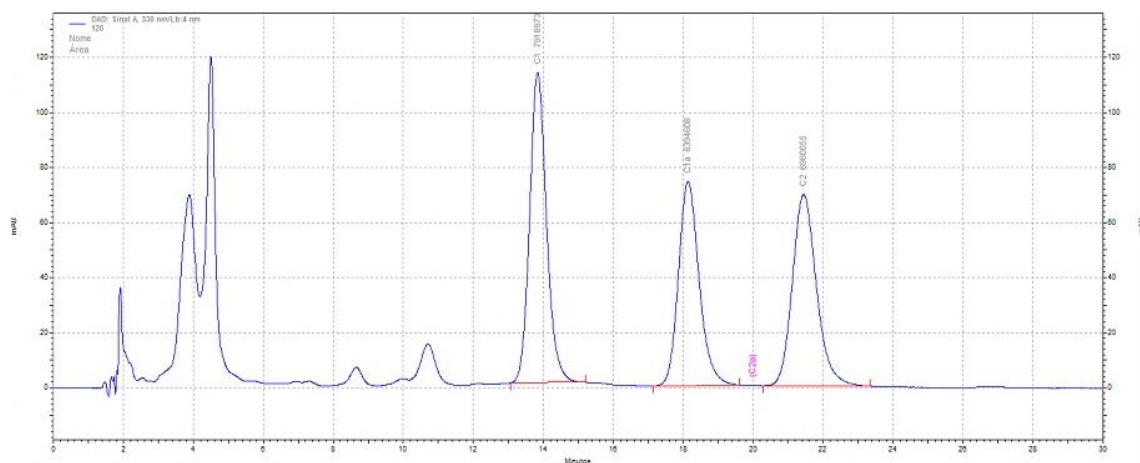


Figura 48. Padrão de Sulfato de gentamicina a 120% replicata 1 do teste de Exatidão.

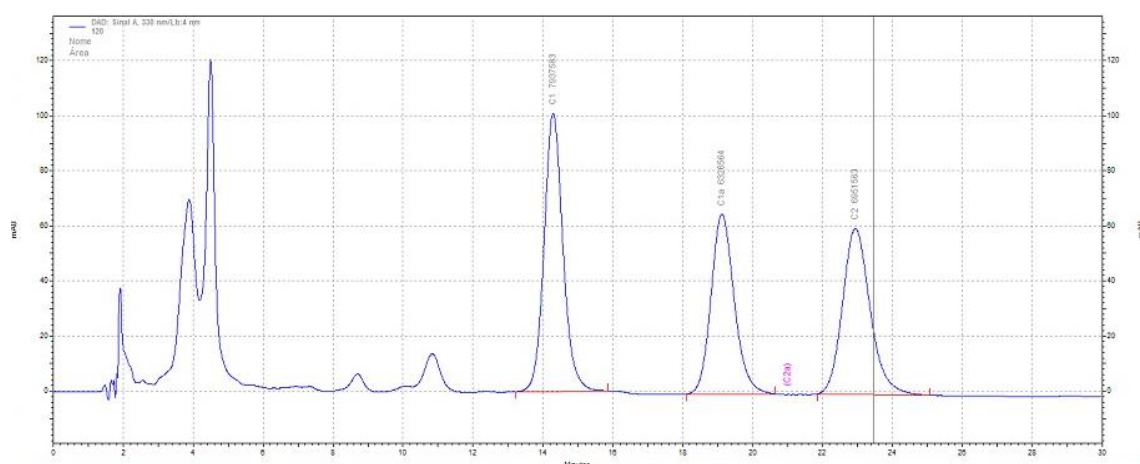


Figura 49. Padrão de Sulfato de gentamicina a 120% replicata 2 do teste de Exatidão.

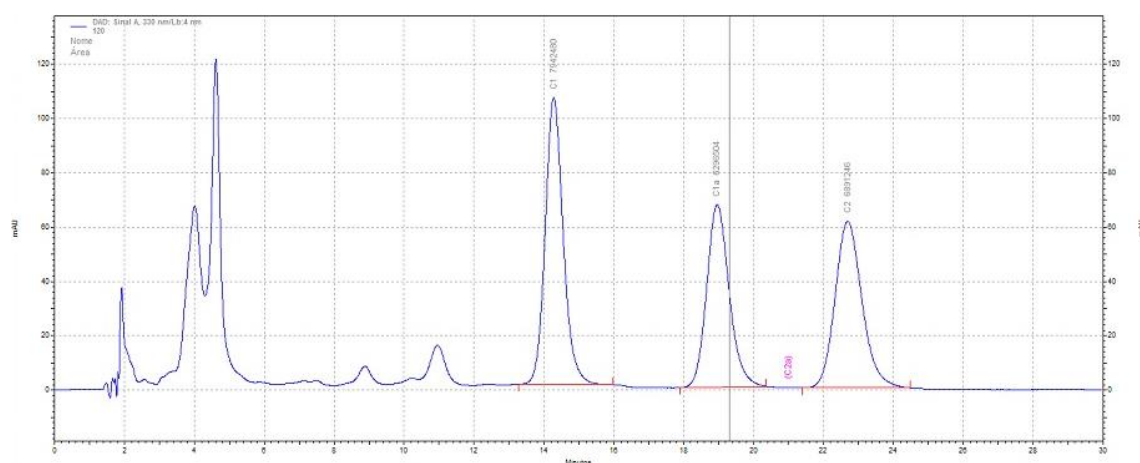


Figura 50. Padrão de Sulfato de gentamicina a 120% replicata 3 do teste de Exatidão.

ANEXO III – Cromatogramas validação do método – Seletividade

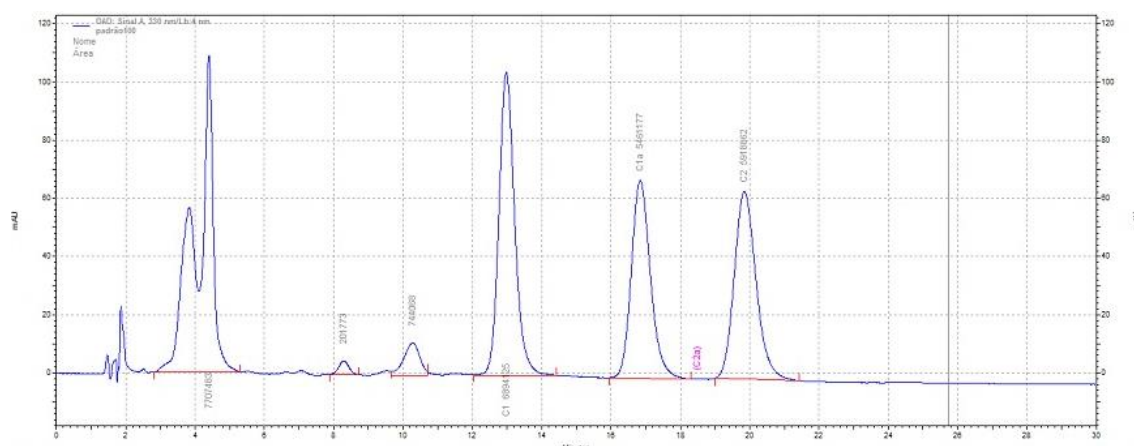


Figura 51. Padrão de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml replicata 1 do teste de Seletividade.

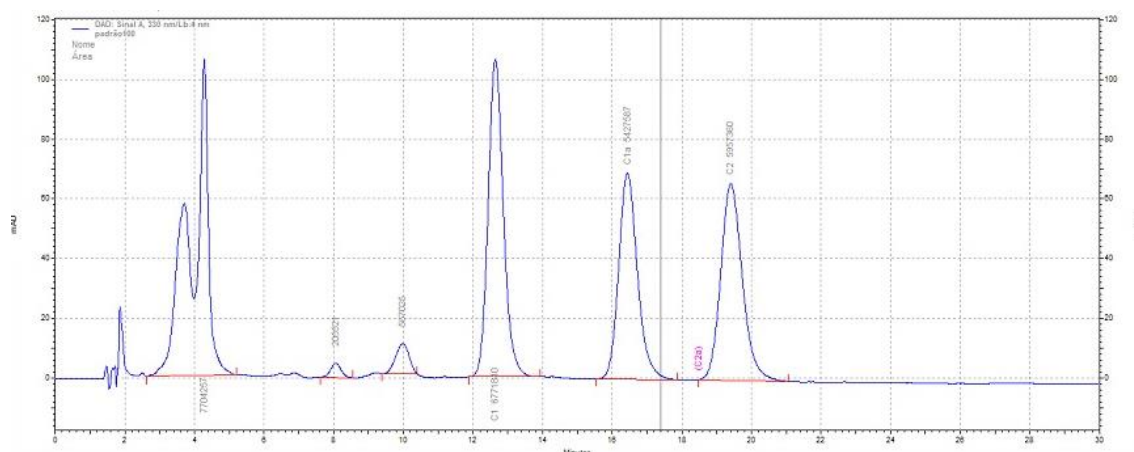


Figura 52. Padrão de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml replicata 2 do teste de Seletividade.

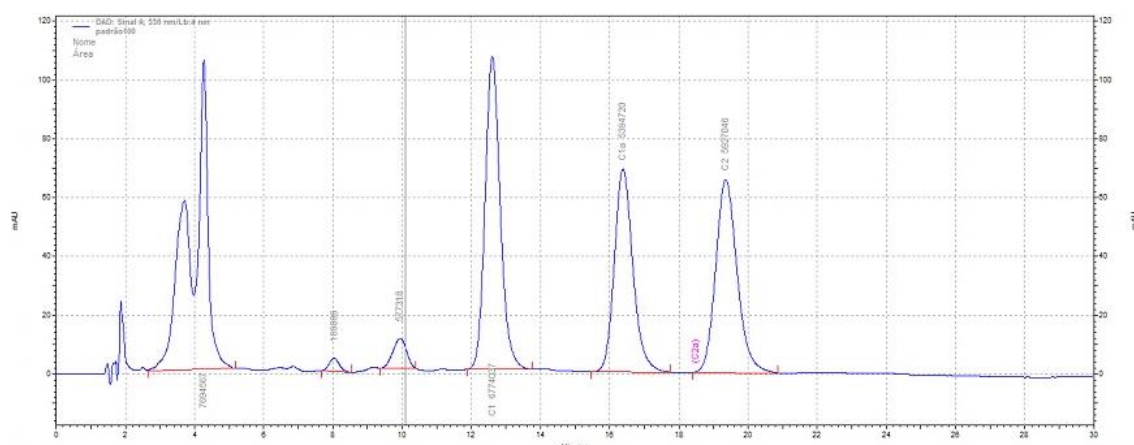


Figura 53. Padrão de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml replicata 3 do teste de Seletividade.

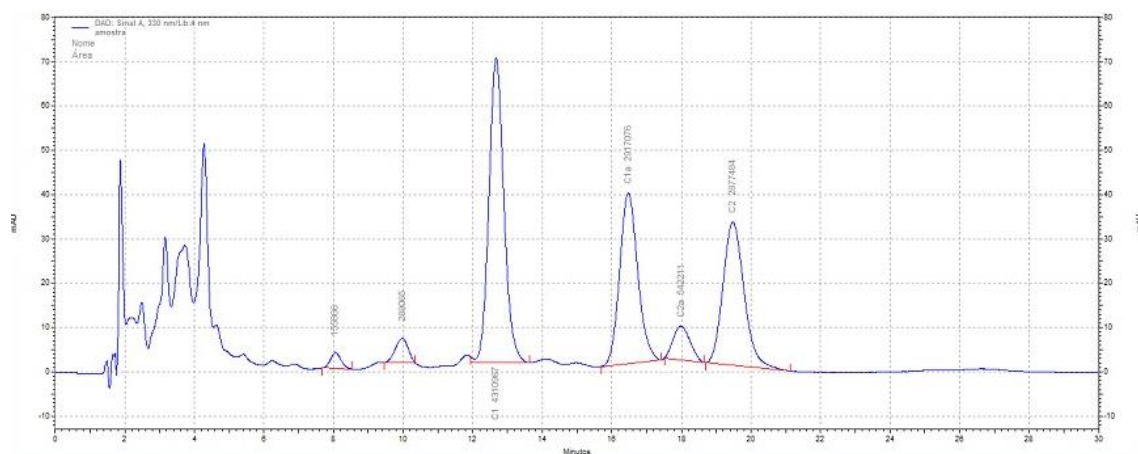


Figura 54. Amostra de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml replicata 1 do teste de Seletividade.

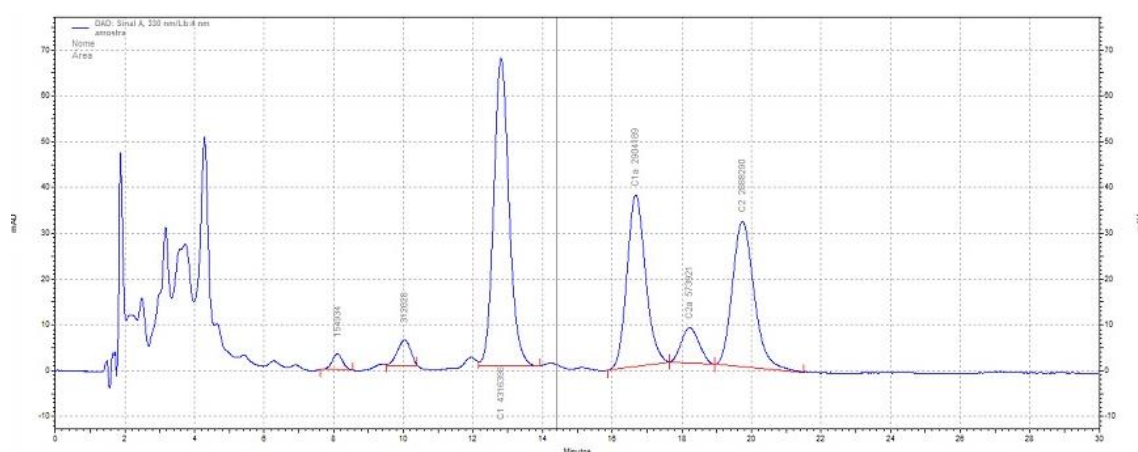


Figura 55. Amostra de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml replicata 1 do teste de Seletividade.

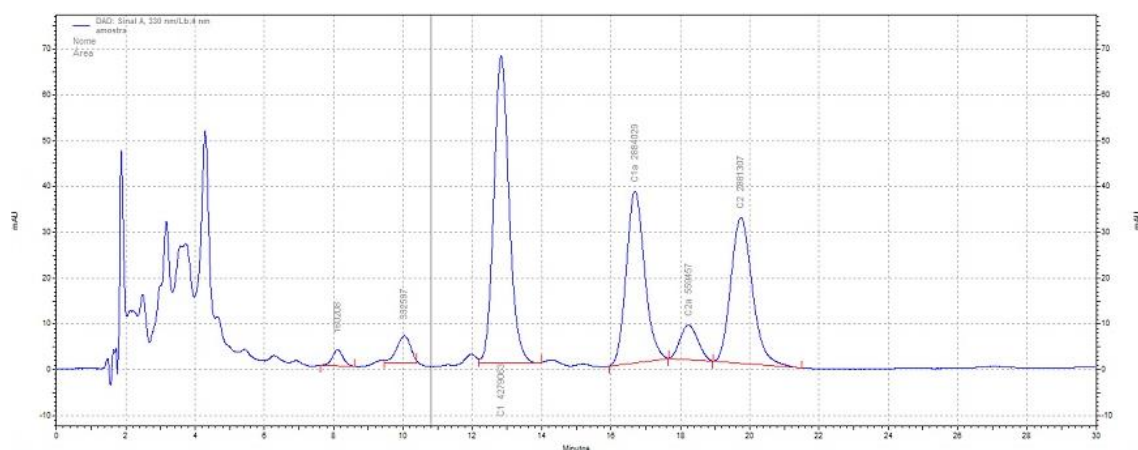


Figura 56. Amostra de sulfato de gentamicina à 0,26mg/ml replicata 1 do teste de Seletividade.

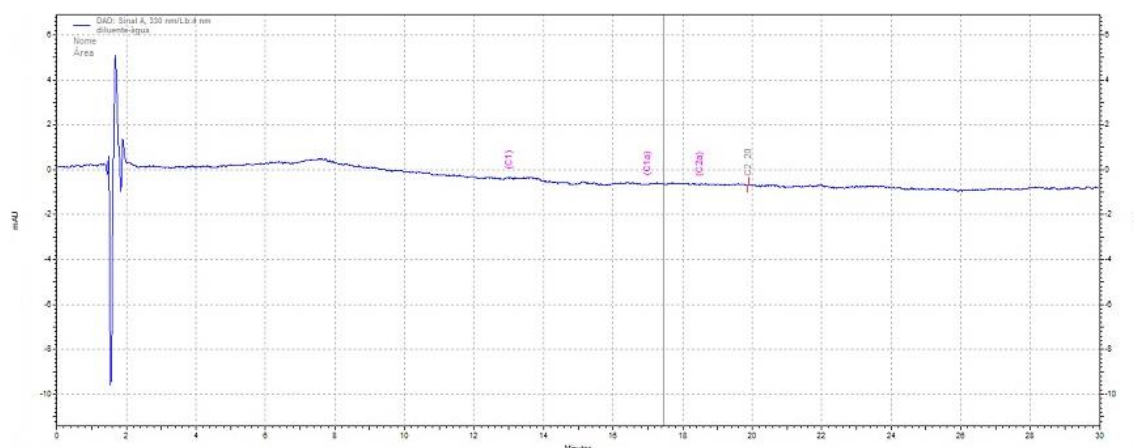


Figura 57. Diluente – Água Purificada - replicata 1 do teste de Seletividade.

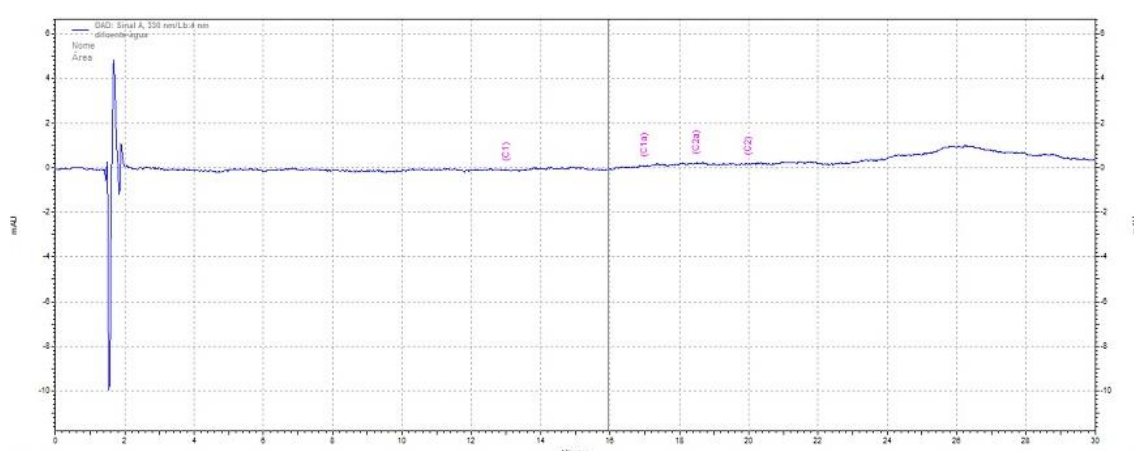


Figura 58. Diluente – Água Purificada - replicata 2 do teste de Seletividade.

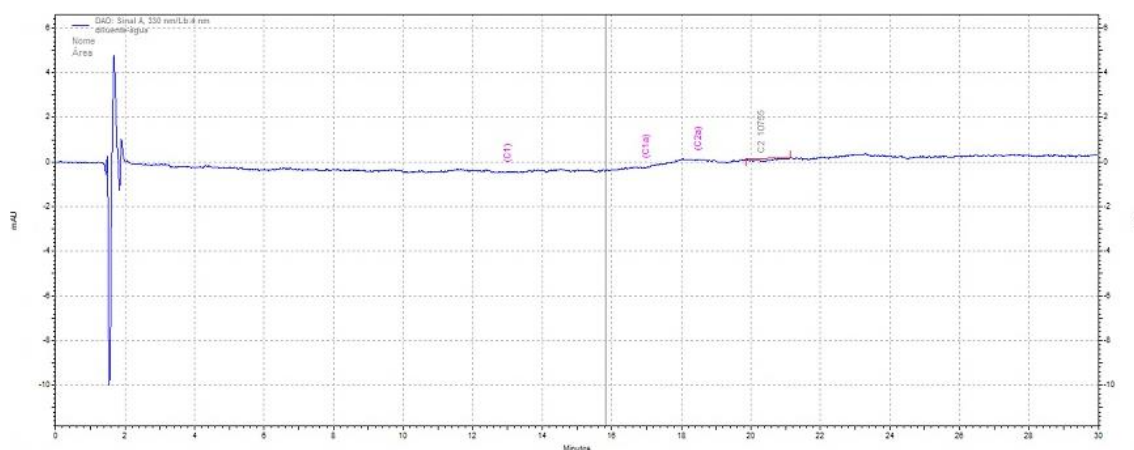


Figura 59. Diluente – Água Purificada - replicata 3 do teste de Seletividade.

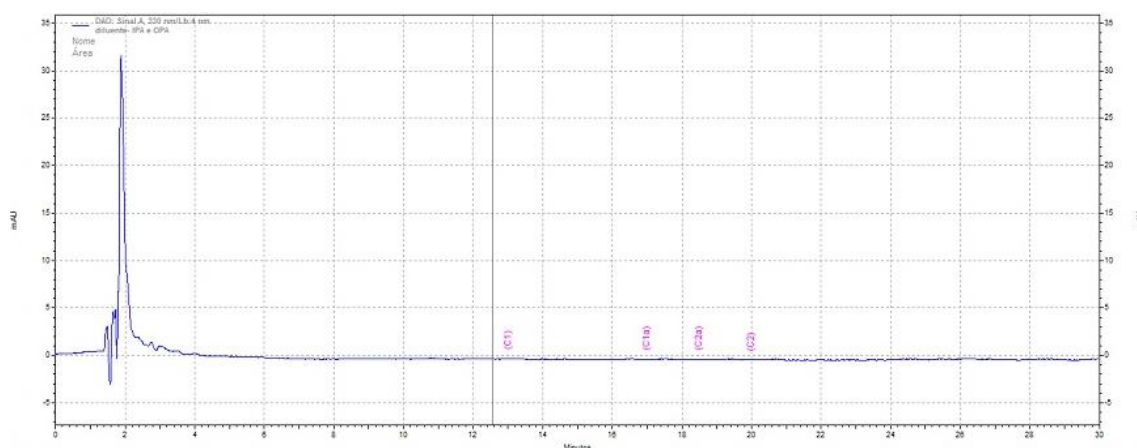


Figura 60. Diluente – Água isopropanol e o-ftalaldeído - replicata 1 do teste de Seletividade.

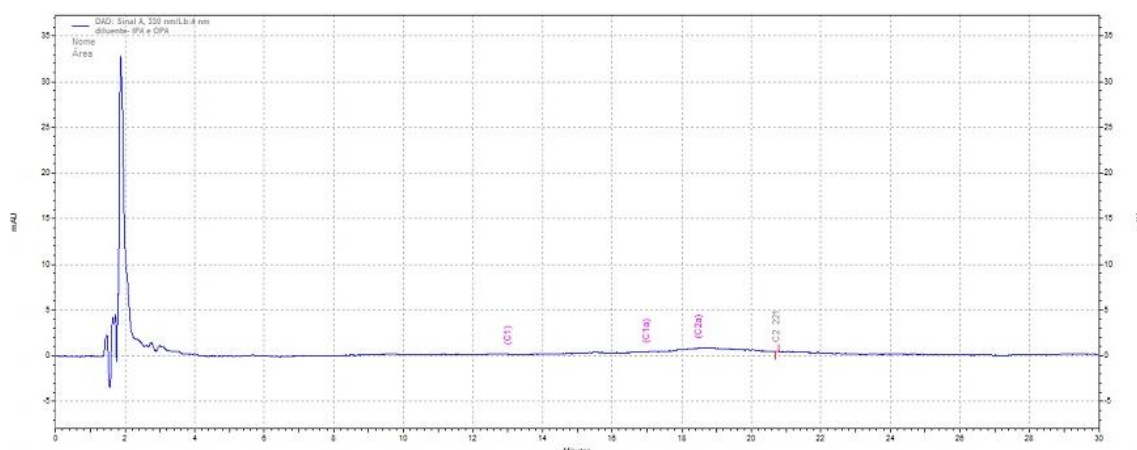


Figura 61. Diluente – Água isopropanol e o-ftalaldeído - replicata 2 do teste de Seletividade.

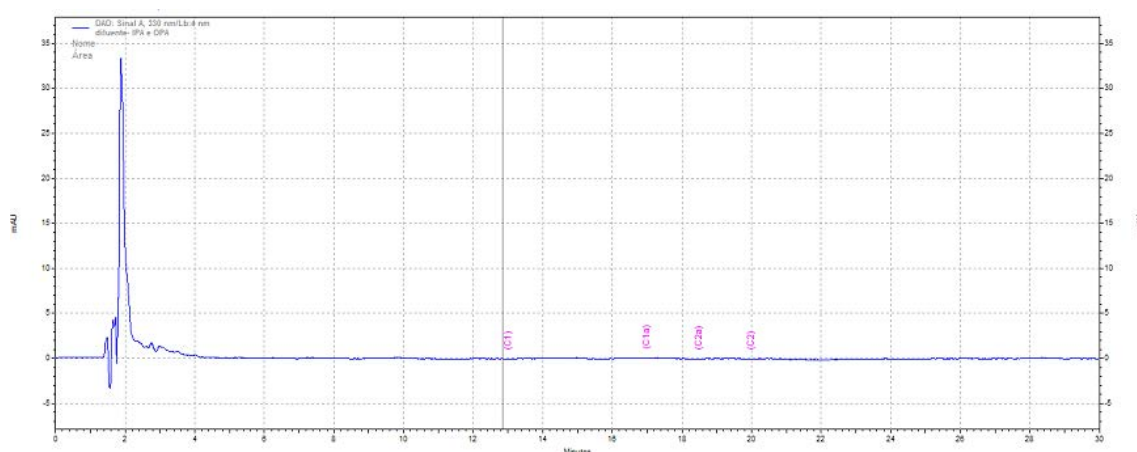


Figura 62. Diluente – Água isopropanol e o-ftalaldeído - replicata 3 do teste de Seletividade.