MONICA JOHANNA MARTÍNEZ MEJÍA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

CAMPINAS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

MONICA JOHANNA MARTÍNEZ MEJÍA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SUSANNE RATH

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ARESENTADA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA NA ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR MONICA JOHANNA MARTÍNEZ MEJÍA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SUSANNE RATH.

_____
Assinatura da Orientadora

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR DANIELLE DANTAS DE SOUSA - CRB8/6490 - BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

M366d

Martínez Mejía, Monica Johanna (1987-).
Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de aminoglicosídeos em medicamentos veterinários / Monica Johanna Martínez Mejía – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientadora: Susanne Rath.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Antimicrobianos. 2. Medicamentos veterinários. 3. Cromatografia líquida. I. Rath, Susanne. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Development and validation of methods for the determination of aminoglycoside veterinary drug

Palavras-chave em inglês:
Antimicrobial
Veterinary drugs
Liquid chromatography

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:
Susanne Rath [Orientadora]
Cláudia Hoffmann Kowalski Schröder
José Alberto Fracassi da Silva

Data de defesa: 17/07/2013

Programa de pós-graduação: Química

Dedico este trabalho,

A minha mãe Angelina, que apesar da distância, seu apoio foi incondicional.

As meus tios Melania, Blanca e Roberto que me apoiaram.

Ao Javier por todo amor, apoio e compreensão nestes anos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me enche de seu Espírito Santo e acalma a minha alma.

À minha orientadora Profa. Dra. Susanne Rath, pela orientação e ensinamentos. Muito obrigada pelo apoio, confiança e paciência. Pela oportunidade de trabalhar e aprender junto de você.

À minha família por todo o apoio e cada uma de suas ligações. Muitas saudades de vocês.

Ao Javier pela paciência e compreensão. Por querer viver juntos esta nova etapa da nossa vida.

Aos colegas, companheiros e amigos do grupo Paracelsus: Cyntia, Ricardo, Andreza, Keity, Livia, Leonardo, Renata e Leandro que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada, vocês além de ensinar química e português, me deram uma amizade sincera.

Cyntia e Ricardo muito obrigada pelo apoio e ajudas prestadas no decorrer do tempo. E um prazer conhecer pessoas como vocês.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida, as agências de fomento CNPq e FAPESP.

À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química, pela oportunidade concedida.

À CPG do Instituto de Química/UNICAMP pela atenção com que se dirige aos alunos.

Aos funcionários do Instituto de Química/UNICAMP pela prestação de serviços e a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

Monica Johanna Martínez Mejía

Formação acadêmica

Superior Bacharelado em Química
Universidade Industrial de Santander, UIS
Departamento de Química
Período: 2004-2010

Pós-graduação
Mestrado em Química Analítica
Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Química Analítica
Período: 2011-2013

Atividades de Pesquisa

Projeto de iniciação científica – Laboratório de Cromatografia e espectrometria de massas, Universidade Industrial de Santander (Colômbia).
Implementação de um método HS-SPME-GC para análise de pesticidas em leite.

Atividades Profissionais em Química

Assistente técnico de laboratório, no Laboratório de Cromatografia adstrito ao centro de pesquisa em Biomoléculas CIBIMOL.

Profissional de laboratório, no Laboratório de Cromatografia adstrito ao centro de pesquisa em Biomoléculas CIBIMOL. Prestação de serviços de análise cromatográficos.

Estágio Docente

Programa de Estágio Docente da Unicamp, na disciplina QA-316 Química Analítica III.

Trabalhos apresentados em congressos

Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, COLACRO XIV, 2012.
Florianópolis (SC), Brasil.
Apresentação pôster: "Detecção amperométrica pulsada de estreptomicina e diidroestreptomicina após separação cromatográfica".

XXIX Congreso Latinoamericano de Química- CLAQ 2010.
Centro de Convenciones de Cartagena de Indias, Colômbia. 2010
Apresentação poster: “Implementación de un método HS/SPME-GC/ECD para la determinación de residuos de pesticidas en leche”.
Apresentação de pôster: “Implementación de una metodología GC/ECD para la determinación de glifosato en agua”.

X Congreso Colombiano de Fitoquímica.
Universidad del Cauca. Popayán, Colômbia. 2009
Apresentação oral : “Estudio de la composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de cinco especies vegetales de la familia Asterácea”. Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad del Cauca. ISSN-1909-9959.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

Medicamentos veterinários têm sido amplamente empregados na cadeia de produção animal a fim de assegurar a saúde do animal e aumentar a produtividade. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) tem como uma de suas prioridades atuais a fiscalização de medicamentos veterinários comercializados a nível nacional e este trabalho teve como objetivo fortalecer esta ação junto ao Lanagro de Campinas, SP. O principal foco foi o desenvolvimento e validação de método para a determinação dos antimicrobianos aminoglicosídeos estreptomicina e diidroestreptomicina por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por amperometria pulsada (HPLC-PAD). O comportamento eletroquímico dos compostos foi previamente estudado por voltametria cíclica, usando o eletrodo de ouro como eletrodo de trabalho. As condições ótimas do detector amperométrico foram definidas mediante planejamento experimental. A separação dos antimicrobianos foi realizada em uma coluna de troca aniônica (Carbopac PA1) e uma fase móvel composta de 0.070 mol L^{-1} de NaOH. Como padrão interno foi usado a glicose. Os potenciais ótimos do pulso amperométrico foram: E_{det}= 0,1 V (t_{det}= 400 ms), E_{oxid}= 0,85 V (t_{oxi}= 400 ms) e E_{ativ}= -0,65 V (t_{ativ}= 400 ms). O método foi validado conforme Guia de Validação publicado pelo MAPA em 2011 e aplicado na análise de amostras contendo estreptomicina e diidroestreptomicina associados a outros compostos, em formulações de pó solúvel, suspensão injetável e unguento intramamário.

DEVELOPMENT AND METHOD VALIDATION
FOR THE DETERMINATION OF AMINOGLYCOSIDES IN VETERINARY DRUGS

Veterinary drugs have been widely used in animal production in order to ensure both animal health and increase productivity. One of the current priorities of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply of Brazil (MAPA) is the inspection of veterinary drugs on the national market with the focus to enhance the practices of the National Laboratory Lanagro Campinas, SP. The main objective was the development and validation of a method for the determination of the aminoglycoside antimicrobials streptomycin and dihydrostreptomycin using high performance liquid chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPLC-PAD). The electrochemical behavior of the compounds was previously studied by cyclic voltammetry, using a gold electrode as working electrode. The optima conditions of the amperometric detector were defined by an experimental design. The separation of the antimicrobials was performed on an anion exchange column (Carbopac PA1) and a mobile phase of 0.070 mol L^{-1} NaOH. Glucose was used as internal standard. The optimal potential of the triple pulse waveform of the amperometric detector were: E_{det} = 0.1 V (t_{det} = 400 ms and t_{int} = 200 ms), E_{oxid} = 0.85 V (t_{oxid} = 400 ms) and E_{ativ} = -0.65 V (t_{ativ} = 400 ms). The method was validated according to the Guide of Validation published by MAPA in 2011 and applied to the analyses of samples containing streptomycin and dihydrostreptomycin associated with other compounds in soluble powder formulations, injectable suspensions and intramammary ointments.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS xix
LISTA DE TABELAS xxi
LISTA DE FIGURAS xxiii

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. MEDICAMENTOS DE USO VETERINARIO 1
1.2. ANTIMICROBIANOS 3
1.2.1. Os antimicrobianos aminoglicosídeos na medicina veterinária 6
1.2.2. Estrutura química dos aminoglicosídeos 7
1.2.3. Mecanismo de ação antimicrobiana dos aminoglicosídeos 9
1.2.4. Levantamento de medicamentos veterinários à base de aminoglicosídeos 11
1.2.5. Estreptomicina e Diidroestreptomicina 13
1.3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINOGLÍCOSIDEOS EM MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO 16
1.3.1. O estado da arte dos métodos analíticos para a determinação de aminoglicosídeos em medicamentos de uso veterinário 16
1.3.2. MÉTODOS DE DETEÇÃO ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS 21
1.4. MÉTODOS FARMACOPEICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS EM MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO 30
1.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS 31
1.5.1. Parâmetros analíticos para validação de métodos, proposto no guia do MAPA 32

2. OBJETIVO 39

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 39

3. PARTE EXPERIMENTAL 41

3.1. REAGENTES, SOLVENTES E PADRÕES 41
3.2. EQUIPAMENTOS 41
3.3. MATERIAIS 42
3.3.1. Colunas cromatográficas 42
3.3.2. Amostras 43
3.4. METODOLOGIA 44
3.4.1. Preparo de soluções padrão 44
3.4.2. Preparo das amostras 44
3.4.3. Avaliação das condições para a detecção eletroquímica dos aminoglicosídeos 45
3.4.4. Desenvolvimento do método cromatográfico e parâmetros de conformidade do sistema 51

3.4.4.2. Condições cromatográficas e do detector amperometrico pulsado. 51
3.4.5. Validação do método cromatográfico para a quantificação dos aminoglicosídeos em fármacos de uso veterinário 52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 61
4.1. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DOS AMINOGLICOSÍDEOS 61
4.1.1. Estudo do comportamento voltamétrico dos aminoglicosídeos sobre o eletrodo de ouro, usando voltametria cíclica 61
4.1.2. Parâmetros para a detecção amperométrica pulsada associada à cromatografia líquida de alta eficiência 66
4.1.3. Otimização dos parâmetros de amperométrica de STRE e DHS mediante o planejamento experimental 2^3 + pontos axiais 70
4.1.4. Estudo do efeito dos tempos de aplicação dos potenciais 78
4.1.5. Avaliação da repetitividade do método 79
4.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO E PARÂMETROS DE CONFORMIDADE DO SISTEMA 80
4.2.1. Efeito da força cromatográfica 80
4.2.2. Produtos de degradação térmica de Estreptomicina e Diidroestreptomicina 81
4.2.3. Conformidade do sistema cromatográfico 82
4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO E PARÂMETROS DE CONFORMIDADE DO SISTEMA 85
4.3.1. Estabilidade das soluções de STRE e DHS 85
4.3.2. Seletividade do método 86
4.3.3. Curva analítica 89
4.3.4. Efeito matriz 94
4.3.5. Precisão 95
4.3.6. Exatidão (veracidade) 96
4.3.7. Robustez 97
4.4. QUANTIFICAÇÃO DOS AMINOGLICOSÍDEOS: ESTREPTOMICINA E DIIDROESTREPTOMICINA EM AMOSTRAS COMERCIALMENTE DISPONÍVEIS DE MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO 100
5. CONCLUSÕES 105
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 109
ANEXO 1 119
ANEXO 2 120

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Aminoglicosídeos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química a pressão atmosférica (*Atmospheric-pressure chemical ionization)*
API	Ionização a pressão atmosférica (*Atmospheric pressure ionization)*
CAD	Detector Corona *(Charged Aerosol Detectors)*
CGAL	Coordenação Geral de Apoio Laboratorial
CPV	Coordenação de Produtos Veterinários
CV	Voltametria cíclica (cyclic *voltammetry)*
CVMP	Comitê de Produtos Médicos e Veterinários (*Committee for Veterinary Medical Products)*
DC	Corrente direta (*Direct current)*
DHS	Diidroestreptomicina
ELSD	Detector por espalhamento da luz *(Evaporative Light Scattering Detecto*r)
EPA	Agência de Proteção Ambiental (*Enviromental Protection Agency*)
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization)*
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (*High-performance liquid chromatography)*
HPLC - PAD	Cromatografia líquida de alta Eficiência – detecção amperométrica pulsada (*High Performance Liquid Chromatography - Pulsed Amperometric Detection)*
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental
JECFA- *Joint FAO/WHO*	Comitê científico internacional de especialistas em aditivos alimentares *(Joint Expert Committee on Food Additives)*
Lanagro	Laboratório Nacional Agropecuário

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Espectrometria de massas (*Mass spectrometry)*
PAD	Detecção amperométrica pulsada (*Pulsed Amperometric Detection)*
RSD	Estimativa do desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
STRE	Estreptomicina
UV / VIS	Espectroscopia ultravioleta visível (*Ultraviolet–visible spectroscopy)*
WHO	Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações básicas sobre as amostras de medicamentos veterinários analisados. 43

Tabela 2. Variáveis e níveis do planejamento experimental fatorial. 48

Tabela 3. Planilha do planejamento experimental fatorial completo. 49

Tabela 4. Condições de estocagem para o estudo de estabilidade dos AG em solução. 53

Tabela 5. Fatores avaliados no ensaio de robustez para STRE e DHS. 58

Tabela 6. Matriz de experimentos na determinação da robustez do método desenvolvido para STRE e DHS. 58

Tabela 7. Matriz de experimentos do planejamento composto central e respostas de área cromatográfica para os padrões de STRE e DHS. 70

Tabela 8. Coeficientes de regressão para a resposta da área cromatográfica do padrão de STRE. 71

Tabela 9. Resumo da análise da regressão, ANOVA para a área cromatográfica do padrão STRE. 72

Tabela 10. Variáveis e níveis do planejamento de otimização. 75

Tabela 11. Matriz de experimentos do planejamento de otimização das respostas cromatográficas para os padrões de STRE e DHS. 75

Tabela 12. Efeitos estimados do planejamento de otimização para a resposta do padrão de STRE. 76

Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) para a resposta da área cromatográfica da STRE. 77

Tabela 14. Potenciais ótimos para a detecção simultânea dos aminoglicosídeos STRE e DHS. 78

Tabela 15. Avaliação da repetibilidade na resposta cromatográfica e no tempo de retenção. 80

Tabela 16. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos para a STRE e DHS nas condições otimizadas. 84

Tabela 17. Parâmetros de regressão linear e coeficientes de correlação (r) das curvas obtidas para a STRE e para a DHS com suas incertezas associadas (p=0,05). 94

Tabela 18. Avaliação do efeito da matriz para STRE. 95

Tabela 19. Valores obtidos para os ensaios de precisão e exatidão para STRE e DHS. 96

Tabela 20. Fatores avaliados no ensaio de robustez para STRE e DHS. 98

Tabela 21. Teores médios de STRE e DHS determinados em amostras de medicamentos veterinários. 103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do anel ciclitol, dos aminoglicosídeos. 8

Figura 2. Estrutura química dos aminoglicosídeos neomicina, estreptomicina, e gentamicina. 8

Figura 3. Mecanismo de ação antimicrobiana dos AG (adaptado de http://www.webmedcentral.com/wmcpdf/Article_with_review_WMC002744.pdf). 10

Figura 4. Produtos veterinários aminoglicosídeos com licença vigente em 2012 (SINDAN, 2012). 11

Figura 5. Número de medicamentos contendo STRE e DHS como princípios ativos comercializados no Brasil, categorizados por formas farmacêuticas. 12

Figura 6. Fármacos associados a medicamentos, dos medicamentos comercializados contendo STRE e DHS. 12

Figura 7. Estrutura química dos aminoglicosídeos estreptomicina e diidroestreptomicina. 13

Figura 8. Equilíbrios de protonação do aminoglicosídeo estreptomicina. 14

Figura 9. Estruturas de ressonância dos grupos guanidinos. 15

Figura 10. Mecanismo de oxidação da glicose no eletrodo de ouro em meio alcalino (adaptado de Larew e Johnson, 1989). 24

Figura 11. Forma do pulso de três potenciais para a detecção amperométrica de AG e carboidrato. 27

Figura 12. Forma do pulso de quatro potenciais para a detecção amperométrica de AG e carboidratos. 28

Figura 13. Forma do pulso de seis potenciais para a detecção amperométrica de AG. 29

Figura 14. Voltamogramas cíclicos obtidos para a STRE (30 µmol L^{-1}) sobre o eletrodo de ouro, eletrólito suporte solução de 0,1 mol L^{-1} de NaOH; v = 100 mV s^{-1}. (--) Perfil do eletrodo de ouro e (--) perfil após adição de STRE. O sinal d corresponde a corrente de oxidação dos grupos hidroxilo, e dos grupos amino e f o sinal de redução do oxido de ouro. 62

Figura 15. Voltamogramas cíclicos obtidos para a DHS (30 µmol L^{-1}) sobre o eletrodo de ouro, eletrólito suporte solução de 0,1 mol L^{-1} de NaOH; v = 100 mV s^{-1}. (--) Perfil do eletrodo de ouro e (--) perfil após adição de DHS. 63

Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos para a STRE sobre o eletrodo de ouro, eletrólito suporte solução de 0,1 mol L^{-1} de NaOH; v = 100 mV s^{-1}.) (--) Perfil do

eletrodo de ouro, perfil após adição de STRE correspondente a concentrações de 4 (--), 12 (--), 20 (--), 30 (--) µmol L^{-1}..... 64

Figura 17. Dependência das correntes anódicas de em função da concentração do padrão de STRE: (-■-) corrente medida a 0,2 V e (-■-) corrente medida a 0,5 V..... 65

Figura 18. Dependência linear das correntes de pico do padrão de STRE em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. $I_{pe=}$ corrente do sinal de oxidação do grupo amino é $I_{pd=}$ corrente do sinal de oxidação do álcool. 66

Figura 19. Variação da resposta cromatográfica da STRE em função do potencial de ativação. 68

Figura 20. Cromatogramas obtidos para STRE (5 µg mL^{-1}). Condições cromatográficas: coluna CarboPac PA1, eluição isocrática com NaOH 0,10 mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}. Volume de injeção: 20 µL. Detecção amperométrica pulsada: (A) E_1= 0,10 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,8 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,50 V aplicado durante 200 ms. (B) E_1= 0,10 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,8 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,15 V aplicado durante 200 ms..... 69

Figura 21. Gráfico de Pareto de efeitos padronizados (A) e gráfico de interações para STRE (B). 72

Figura 22. Superfície de resposta do planejamento experimental para STRE ao aplicar potenciais (A) E_3= -0,4 V e (B) E_3= -0,6 V. 73

Figura 23. (A) Gráfico de pareto de efeitos padronizados para DHS e (B) Gráfico de efeitos principais DHS: nesta análise o fator de interesse é variado de seu baixo nível de seu alto nível, enquanto todos os outros fatores são mantidos constantes em seus valores centrais. 74

Figura 24. Superfície de resposta do planejamento experimental de otimização para (A) STRE e (B) DHS, onde E_2 foi fixado em 0,8 V. 77

Figura 25. Variação da resposta cromatográfica do (-•-) DHS e (-•-) STRE, em função do potencial aplicado em cada etapa do pulso. 78

Figura 26. Cromatograma obtido para a separação de STRE (1) e DHS (2). Condições cromatográficas: coluna CarboPac PA1, eluição isocrática com NaOH 0,10 mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}. Volume de injeção: 20 µL. Detecção amperométrica pulsada: E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,65 V aplicado durante 200 ms. Concentração do STRE e DHS: 5 µg mL^{-1}. 79

Figura 27. Efeito da força cromatográfica na eficiência (N -♦-) e no fator de retenção (k -■-)..... 81

Figura 28. Cromatogramas das soluções de STRE submetidas à temperatura de 70 °C após o período de 1 hora e 24 horas. A impureza majoritária é o pico 1 e a STRE o pico 2. Condições cromatográficas: coluna CarboPac PA1, eluição isocrática com FM NaOH 0,07 mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}. Volume de injeção: 20 µL. Detecção amperométrica pulsada: E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,65 V aplicado durante 200 ms. Concentração de STRE: 30 µg mL^{-1}..... 82

Figura 29. Cromatograma obtido para a separação de DHS (4), STRE (3), padrão interno GLU (2), impureza majoritária da STRE (1). Condições cromatográficas: coluna CarboPac PA1, eluição isocrática com FM NaOH 0,070 mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}. Volume de injeção: 20 µL. Detecção amperométrica pulsada: E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,65 V aplicado durante 200 ms. Concentração do STRE e DHS de 20 µg mL^{-1} e a de glicose e 0,5 µg mL^{-1}..... 84

Figura 30. Estabilidade da solução estoque de (A) DHS e (B) STRE armazenadas à temperatura ambiente em frascos transparentes (AT); âmbar (AA) e em geladeira a 4 °C, em frasco transparente (GT) e em frasco âmbar (GA). 85

Figura 31. Cromatogramas das soluções de trabalho recém preparadas (controle) e das soluções de STRE e DHS submetidas às condições de estresse, após o período de 1 hora e 24 horas. Condições cromatográficas: coluna CarboPac PA1, eluição isocrática com FM NaOH 0,07 mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}. Volume de injeção: 20 µL. Detecção amperométrica pulsada: E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,65 V aplicado durante 200 ms. Concentração do STRE e DHS: 20 µg mL^{-1}. 88

Figura 32. Curva dinâmica no solvente para (-■-)STRE e (-■-)DHS..... 90

Figura 33. Curva analítica de trabalho por padronização interna de (a) STRE nas concentrações de 10, 15, 20, 25, 30 µg mL^{-1}. (b) DHS nas concentrações de 10, 15, 20, 25, 30 µg mL^{-1}. Gráfico de resíduos para as curvas de (c) STRE e (d) DHS. O padrão interno foi adicionado na concentração 0,5 µg mL^{-1}. 91

Figura 34. Gráfico de Pareto padronizado do experimento de robustez para (A) STRE e (B) DHS..... 99

Figura 35. Cromatogramas de amostras de medicamento veterinário contendo STRE (2) e DHS (3) como principal ativo com adição do padrão interno glicose (1). Condições cromatográficas: coluna CarboPac PA1, eluição isocrática com FM NaOH 0,070 mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}. Volume de injeção: 20 µL. Detecção amperométrica pulsada: E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,65 V aplicado durante 200 ms. 101

Figura 36. Interpretação de um resultado de medição (adaptado do Manual De Garantia da Qualidade Analítica do MAPA e a Secretaria de Defesa Agropecuária, 2011). 104

1. INTRODUÇÃO

1.1. MEDICAMENTOS DE USO VETERINARIO

A produção animal desempenha um papel muito importante na economia brasileira. Atualmente o país possui o maior rebanho bovino comercial do mundo e, também, é o principal exportador de carne de frango e suína. Ainda, atualmente é o principal exportador de carne bovina do mundo, superando em volume os Estados Unidos e a Austrália com um faturamento de US$ 5,769 bilhões em 2012 (ABIEC, 2013). Este crescimento positivo foi favorecido pela conjuntura internacional, em função dos problemas sanitários enfrentados pela União Europeia, que registrou 783 focos de enfermidades em animais em 2010 (febre aftosa no rebanho, doenças da "vaca louca", a língua azul e a gripe aviária), enquanto no Brasil apenas três surtos foram notificados no mesmo ano. Esse cenário reflete o estado sanitário inquietante da pecuária do velho continente e abre ao Brasil um mercado de oportunidades, na qual a expectativa, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é que até 2020 a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial (MAPA, 2013).

Aliado a este forte crescimento se observa uma grande transformação nos sistemas produtivos. As características e tendências apontam para um modelo de concentração e aumento de escala de produção com vistas à redução dos custos. Cada vez mais os produtores estão interessados em aumentar a produtividade, acelerando o ganho de peso do animal e diminuindo o tempo até o abate (Borges *et al.*, 2010, Andreotti e Franceschi, 2004).

Esta pressão para aumentar a produção fez com que a comercialização de medicamentos veterinários no Brasil aumentasse nos últimos anos, posicionando-o

como um dos cinco maiores mercados veterinários em todo o mundo, com um faturamento, em 2005, de US$ 917 milhões (Capanema *et al.,* 2007). Dos medicamentos utilizados, os agentes antimicrobianos correspondem a uma das classes mais prescritas com um faturamento em 2009 de US$ 349 milhões (SINDAN, 2012). Atualmente, o MAPA autoriza o uso de cerca de 15 compostos antimicrobianos como aditivos na alimentação animal e outros 50 para fins terapêuticos, muitos dos quais são de uso comum entre as diversas espécies animais, como bovinos, suínos, aves, cães e caprinos (MAPA, 2013; Borges *et al.*, 2010).

No Brasil as atividades de regulamentação e fiscalização do mercado de fármacos veterinários, desde os aspectos de registro e licença para produção até a análise fiscal, são exercidas pelo MAPA, mediante a Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL). Com este fim, a demanda atual do CGAL ao Laboratório Nacional Agropecuário de Campinas (Lanagro/SP) é a implementação de metodologias analíticas para a fiscalização de diversos fármacos de uso veterinário, selecionados a partir das prioridades da Coordenação de Produtos Veterinários (CPV). Nesta lista prioritária estão inclusos os antimicrobianos aminoglicosídeos (AG) a serem avaliados neste trabalho: estreptomicina (STRE) e diidroestreptomicina (DHS), os quais correspondem às classes mais prescritas de antimicrobianos no país, além de serem considerados, pela Comissão Europeia, como os antimicrobianos que requerem critérios de controle mais rigorosos (SINDAN, 2012). Cabe ressaltar que, atualmente, os medicamentos veterinários registrados no MAPA não são analisados em nenhum laboratório oficial e a avaliação de conformidade dos produtos produzidos e comercializados pela indústria nacional ainda não é realizada.

1.2. ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos são sustâncias que podem causar a morte (bactericidas) ou inibir o crescimento (bacteriostáticos) de microorganismos patógenos. Quando os antimicrobianos são produzidos por espécies de microorganismos, estes são denominados antibióticos, quando são produzidos de forma sintética, denominam-se quimioterápicos.

Os antimicrobianos usados nas diferentes fases do ciclo de produção das principais espécies animais produtoras de alimentos correspondem principalmente às famílias de betalactamas, tetraciclinas, macrolídeos, aminoglicosídeos (AG) e sulfonamidas (McDermott *et al.*, 2002; Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001).

Particularmente, os antimicrobianos são usados com três propósitos diferentes: (i) tratar enfermidades (terapêutico e metafilático), para o qual são usadas as mesmas classes de compostos de tratamento clínico nos humanos, (ii) prevenir enfermidades causadas pela presença de microrganismos patogênicos (profilático) cuja aplicação é criticada devido a seu possível envolvimento na seleção de bactérias resistentes e da promoção da disseminação de genes de resistência e (iii) melhorar a taxa de crescimento e/ou conversão alimentar (Durante-Mangoni *et al.*, 2009; Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001).

Embora o uso de antimicrobianos veterinários seja necessário nos sistemas de produção, a proteção do consumidor depende do uso destes de acordo com as boas práticas veterinárias no local de produção. Existe uma associação evidenciada entre o uso de antimicrobianos nas unidades de produção animal, o desenvolvimento de resistência antimicrobiana e a sua transferência à população humana. Certamente são diversas as rotas de veiculação dos antimicrobianos aos humanos, pois, além da

possível presença de resíduos que estas substâncias podem deixar nos produtos de origem animal, também podem contaminar diversos compartimentos ambientais. Não obstante, os antimicrobianos podem ser excretados na urina e nas fezes dos animais tratados, tanto na forma do composto original ou já parcialmente metabolizado, disseminando estes compostos no ambiente, podendo ser absorvidos e acumulados nos tecidos vegetais, resultando em risco à saúde humana quando da colheita e consumo de alimentos também de origem vegetal (Kemper, 2008; Sarmah *et al.*, 2006). Cabe ressaltar que, também pode ocorrer transferência de bactérias de resistência simples ou múltipla desenvolvidas no trato intestinal dos animais para o ser humano via consumo de carne, leite ou ovos, as quais podem não ser patogênicas ao homem, mas capazes de transferir sua resistência para bactérias patogênicas nos humanos (gram-negativas: salmonelas, campilobacter; e gram-positivas: *Clostridium perfringens*, entre outros) (Phillips *et al.*, 2004; Van Den Bogaard e Stobberingh, 2000).

Estudos feitos no Brasil demonstraram ocorrências de prevalência do *Streptococcus suis tipo II* em suínos na região de Botucatu (São Paulo, Brasil) e foi verificada resistência antimicrobiana a gentamicina em 35,72% dos animais tratados (Bosco *et al.*, 2000); da mesma forma os autores mostraram grande percentual de resistência bacteriana para amostras contendo *Staphylococcus spp* (bactérias patogênicas que podem causar infecções cutâneas, infecções oportunistas e até mesmo septicemias fatais) isoladas de leite de vacas com mastite clínica e subclínica procedentes da região Agreste (Pernambuco, Brasil), concluindo que os isolados se apresentaram-se resistentes à penicilina e tetraciclina (Oliveira *et al.*, 2002).

O problema é ainda maior, considerando que os antimicrobianos utilizados na medicina veterinária, em geral, são os mesmos ou estão estreitamente relacionados aos antimicrobianos usados na medicina humana, o que pode levar ao aparecimento de bactérias resistentes e acarretar em uma diminuição de eficácia dos tratamentos,

aumento da severidade da infecção, requerendo o uso de antimicrobianos mais potentes e caros (Marshall e Levy, 2011).

Outro aspecto importante está relacionado com a indústria de alimentos, uma vez que durante o preparo de produtos fermentados, a presença de resíduos neste pode alterar o processo de fermentação através da interação dos antimicrobianos com os microorganismos inoculados.

Essas evidências levaram as organizações internacionais ligadas à saúde humana e animal a recomendar prudência no uso de antimicrobianos. De modo geral, verifica-se uma tendência mundial no sentido de redução do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, com vistas a eliminar o potencial risco desses compostos no ambiente. No ano de 2003 a União Europeia publicou uma resolução na qual ficou estabelecido que a partir de janeiro de 2006 seria banido o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação dos animais (European Commission, 2003). No entanto, os antimicrobianos usados para fins terapêuticos continuam sendo utilizados na produção animal, visto que, epidemias podem rapidamente disseminar-se numa criação, provocando alta mortalidade e levando a elevados prejuízos econômicos (Casewell *et al.*, 2003).

Como referido, a temática de resíduos dos antimicrobianos nos alimentos de origem animal é uma das principais preocupações dos órgãos governamentais. Por isso, é requerido que os diferentes medicamentos veterinários sejam registrados nos órgãos reguladores estabelecidos em cada um dos países. No Brasil o registro é realizado junto ao MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Brasil. Mas, em termos de segurança alimentar cada país tem suas estruturas regulamentadoras e procedimentos administrativos, além de autonomia no estabelecimento dos limites máximos de resíduos de contaminantes permitidos nos alimentos (MRL- *Maximum Residue Limits*), baseados nas publicações do *Codex Alimentarius*. O *Codex*

Alimentarius é uma comissão criada pela Organização Mundial de Saúde (WHO- *World Health Organization*) e a Organização para Alimentação e Agricultura (FAO- *Food and Agriculture Organization*) para elaborar o código alimentar ao nível internacional que tem como finalidade proteger a saúde da população, assegurando práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos, fomentando e coordenando todos os trabalhos que se realizam em normalização. Para a elaboração deste código, o *Codex Alimentarius* adota os pareceres do comitê científico internacional de especialistas em aditivos alimentares (JECFA- *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) que avalia o risco de aditivos alimentares e contaminantes. O comitê JECFA estabelece, entre outros, valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) e limites máximos de resíduos (LMR) de fármacos veterinários ou agrotóxicos em alimentos. A IDA é a quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem que provoque danos à saúde e é baseada nas informações toxicológicas disponíveis daquele composto na época da avaliação. No caso de medicamentos veterinários, desde 1987, o JECFA tem avaliado mais de 80 fármacos e proposto seus LMR em diversos alimentos. A maioria desses valores foram adotadas pela Comissão do Codex Alimentarius, após discussões aprofundadas dentro do Comitê do Codex sobre resíduos veterinários em alimentos (Luetzow, 2003).

1.2.1. Os antimicrobianos aminoglicosídeos na medicina veterinária

Os AG são importantes membros do esquema antimicrobiano. O primeiro AG, a estreptomicina (STRE) foi descoberta em 1944 por Waksman e colaboradores, durante a pesquisa de compostos solúveis em água e ativos estáveis contra bactérias gram-negativas a partir de culturas de *Streptomyces griseus*. Esse foi um avanço importante na medicina, principalmente por esses compostos apresentarem atividade anti-tuberculose (Davies, 2007).

Dado o baixo custo de produção dos antimicrobianos AG, eles são muito populares, e amplamente usados na medicina humana, veterinária e na criação de animais produtores de alimentos. Eles exibem um amplo espectro de atividade antimicrobiana para diferentes microorganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, micobactérias, protozoas e infecções de *Neisseria gonorrhoeae.* Em adição, são considerados como uma das poucas classes de antimicrobianos (em conjunto com carbapenos e polimixinas) que ainda retêm atividade contra a grande maioria das estirpes de resistência múltipla. O uso mais frequente dos AG é na terapia de infecções, tais como a septicemia, infecções do trato respiratório, urinário, e intra-abdominal causadas por bacilos aeróbicos Gram-negativos.

Entre os AG mais empregados em formulações veterinárias destacam-se a gentamicina, neomicina, diidroestrepomicina e estreptomicina, sisomicina e ribostamicina, os quais se encontram geralmente associados a penicilinas, uma vez que estas, além de oferecem um sinergismo, aumentam a absorção dos AG (Edson e Terrell, 1999; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999).

No entanto, o uso desses antimicrobianos nos animais é limitado dado seus efeitos adversos como nefrotoxicidade e ototoxicidade, além de poder levar a um bloqueio neuromuscular (Durante-Mangoni *et al.*, 2009; Fanos e Cataldi, 2001; Kaloyanides, 1994; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999).

1.2.2. Estrutura química dos aminoglicosídeos

Os AG têm uma estrutura química característica na qual se tem a presença de dois ou mais grupos de açúcar aminados ligados através de ligações glicosídicas a um anel aminociclitol saturado. Geralmente, nos aminoglicosídeos clinicamente úteis,

esta porção ciclitol é a estreptidina ou 2-deoxistreptamina (**Figura 1**) (Bennett, 1996; Streicher *et al.*, 1983).

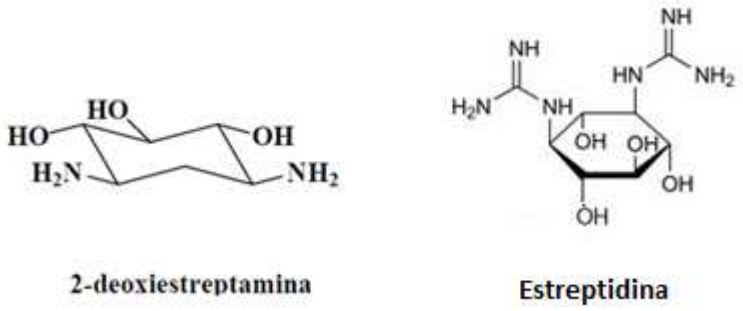

Figura 1. Estrutura química do anel ciclitol, dos aminoglicosídeos.

Os antimicrobianos AG podem ser convenientemente divididos em três tipos estruturais, baseados na posição de suas ligações glicosídicas. Estes tipos estruturais incluem as 4,6-dissubstituídas 2-deoxiestreptaminas, contendo a maioria dos AG clinicamente úteis como a gentamicina, tobramicina, amicacina, e netilmicina, as 4,5-dissubstituídas 2-deoxiestreptaminas (neomicina e paromomicina), e outros atípicos como a estreptomicina que possui como aminociclitol a estreptidina. (**Figura 2)** (Cooper, 1971).

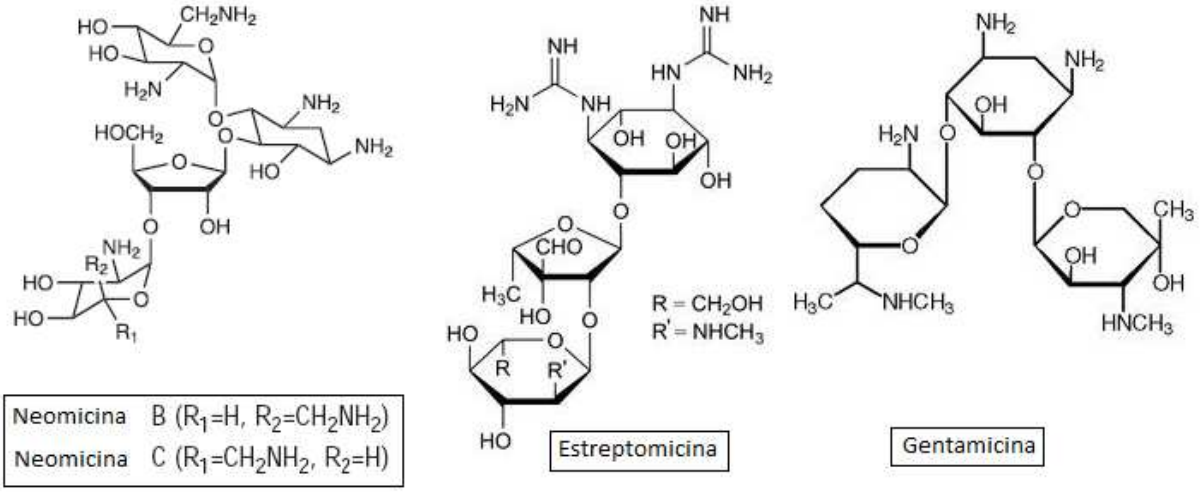

Figura 2. Estrutura química dos aminoglicosídeos neomicina, estreptomicina, e gentamicina.

O conhecimento da estrutura dos AG é importante na compreensão de suas propriedades químicas. Os AG são compostos fortemente polares, altamente solúveis em água, ácidos, e estáveis em solventes polares. Sua solubilidade em metanol é limitada, e são praticamente insolúveis em solventes orgânicos hidrofóbicos. Em soluções aquosas, os AG são normalmente carregados positivamente por causa de seus grupos aminos básicos. Como resultado, os AG são minimamente absorvidos a partir do intestino e praticamente não atravessam a barreira hemato-encefálica. A natureza catiônica dos AG contribui à sua atividade antimicrobiana, já que devido à sua carga positiva eles são capazes de se ligar a lipopolissacarídeos negativamente carregados da parede celular bacteriana e a uma variedade de moléculas aniônicas da membrana celular e intracelular (Benveniste e Davies, 1973; Edson e Terrell, 1999).

Os AG possuem estereoisômeros, e os medicamentos veterinários comercialmente disponíveis são uma mistura destes. Por exemplo, a neomicina tem dois estereoisômeros: neomicina B e C, mas apenas a neomicina B tem propriedades antimicrobianas, além do que a paromoamina e paromomicina I e II ocorrem como impurezas da neomicina. Os estereoisômeros diferem acentuadamente em sua toxicidade e, portanto, nos medicamentos comerciais é preciso verificar a porcentagem declarada de cada um destes.

1.2.3. Mecanismo de ação antimicrobiana dos aminoglicosídeos

O mecanismo de ação antimicrobiano dos AG consiste na inibição irreversível da síntese de proteínas da bactéria. Para atuar, o AG que possui carga elétrica positiva, faz uma interação iônica com a superfície da célula bacteriana e posteriormente é transportado para o interior da célula bacteriana, que tem carga elétrica negativa, por mecanismo passivo associado à diferença de potencial entre as duas faces da membrana celular. O principal local de ação dos AG é a subunidade ribossomal 30S.

No entanto, alguns AG também se ligam a vários sítios na subunidade ribossômica 50S. Os AG perturbam o ciclo normal de função ribossomal por interferir com a iniciação da síntese de proteínas, levando à acumulação de complexos de iniciação anormais (no caso de estreptomicinas e gentamicinas). Também podem causar leitura errada do modelo de RNA mensageiro e incorporação de aminoácidos incorretos na cadeia polipeptídica em crescimento (**Figura 3**). Os AG variam na sua capacidade para induzir a leitura, presumivelmente devido a diferenças das suas afinidades para proteínas específicas ribossomais, o que está fortemente correlacionado com sua atividade bactericida. Embora, os AG são específicos para os ribossomos procarióticos é possível que as maiores concentrações também possam ter efeito sobre a síntese de proteínas nos mamíferos, provavelmente mediante uniões não específicas aos ribossomas e ácidos nucleicos eucarióticos (Davis, 1987; Jana e Deb, 2006; Kotra *et al.*, 2000).

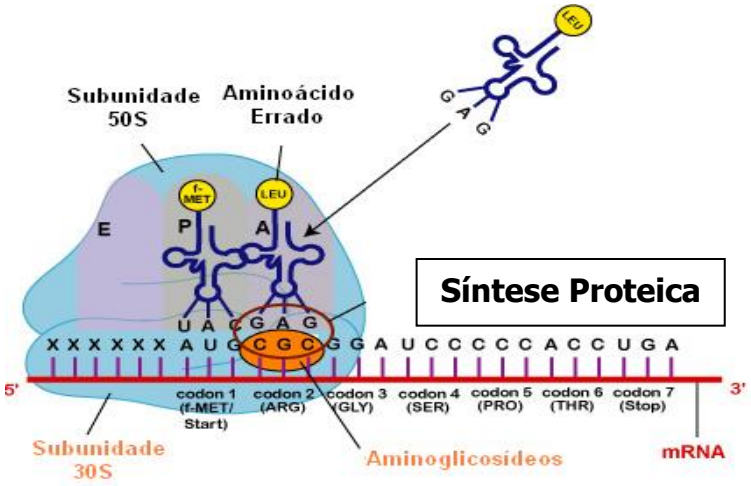

Figura 3. Mecanismo de ação antimicrobiana dos AG (adaptado de http://www.webmedcentral.com/wmcpdf/Article_with_review_WMC002744.pdf).

1.2.4. Levantamento de medicamentos veterinários à base de aminoglicosídeos

Com o objetivo de conhecer a realidade dos medicamentos à base de AG comercializados no Brasil, foi realizado um levantamento, no Compêndio de Produtos Veterinários (CPV) do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), no qual se encontram todos os produtos veterinários registrados no MAPA. Na **Figura 4** estão apresentados os principais AG usados como princípio ativo nas diferentes formulações comercialmente disponíveis no Brasil (140 formulações contendo AG), sendo que os ativos STRE (41) e DHS (17), que foram escolhidos neste trabalho de pesquisa, estão entre os mais usados (SINDAN, 2012).

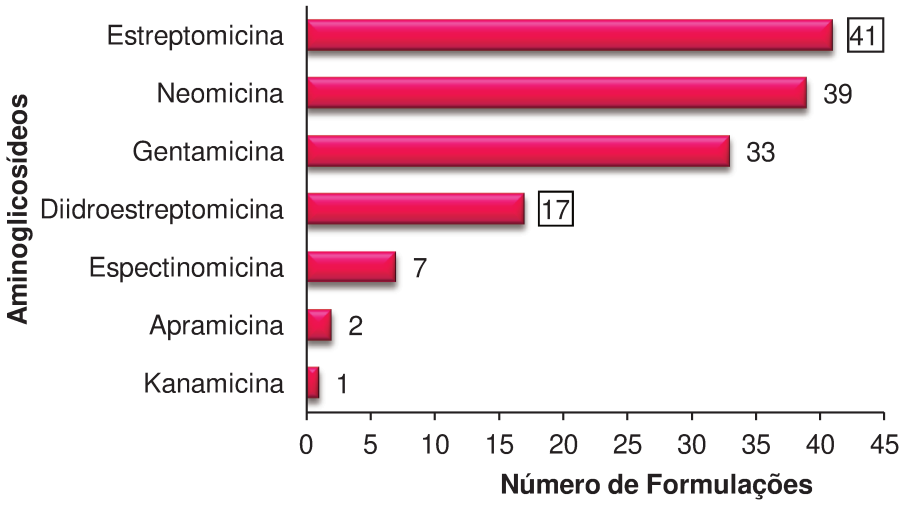

Figura 4. Produtos veterinários aminoglicosídeos com licença vigente em 2012 (SINDAN, 2012).

O número significativo de medicamentos veterinários contendo STRE e DHS como princípios ativos principais usados no Brasil faz destes antimicrobianos um foco de interesse analítico no que diz respeito ao controle de qualidade das dosagens declaradas nos produtos comerciais.

O gráfico da **Figura 5** mostra as diferentes formas farmacêuticas e a quantidade de empresas que comercializam as formulações no Brasil. Cabe destacar que, a maioria das formulações são administradas por injeção intramuscular ou intravenosa, dado que esses antimicrobianos são pouco absorvidos no trato gastrintestinal. Além disso, como pode ser observado na **Figura 6**, os medicamentos contendo AG são combinados com outras substâncias, tais como penicilinas (SINDAN, 2012). Essa associação leva a um sinergismo favorecendo a perturbação do peptidoglicano na parede celular, que é normalmente impermeável aos AG, melhorando, assim, a absorção destes (Durante-Mangoni *et al.*, 2009).

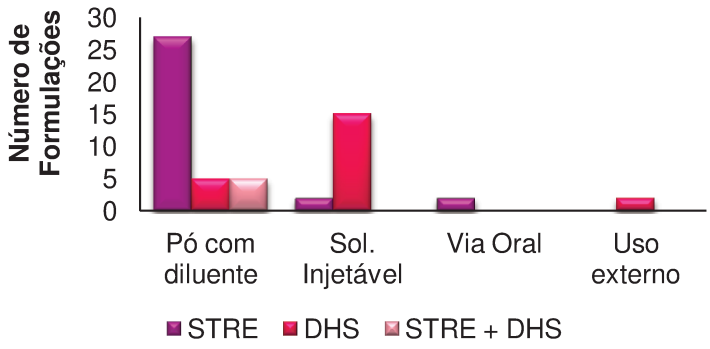

Figura 5. Número de medicamentos contendo STRE e DHS como princípios ativos comercializados no Brasil, categorizados por formas farmacêuticas.

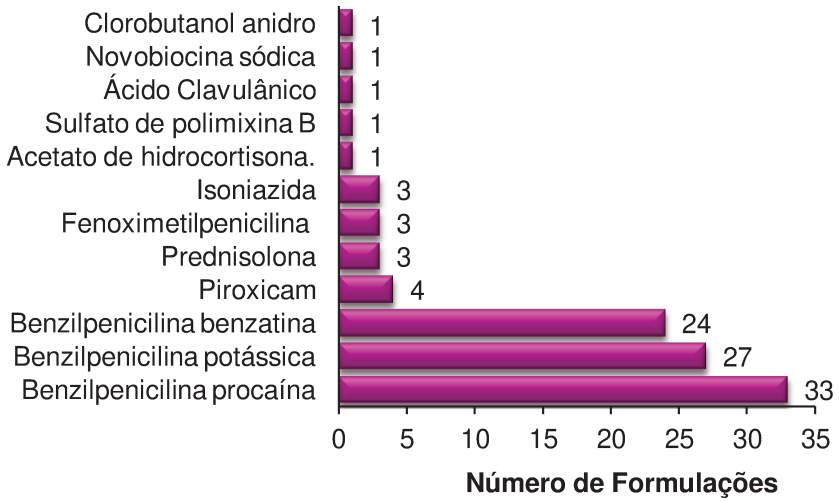

Figura 6. Fármacos associados a medicamentos, dos medicamentos comercializados contendo STRE e DHS.

1.2.5. Estreptomicina e Diidroestreptomicina

A estrutura química de STRE é mostrada na **Figura 7**. Este composto é um trissacarídeo, formado a partir da molécula de estreptidina (1,3-diguanido-2,4,5,6-tetraidroxicicloexano), a estreptosa e 2-desoxi-2-metilamino L glicose, unidos mediante ligações glicosídicas na configuração alfa. A diferença entre a DHS e a STRE é que a DHS tem um grupo hidroximetilo (CH_2OH) no lugar do grupo aldeído (CHO) da porção do núcleo de estreptosa (Demain e Inamine, 1970; Orgovan e Noszal, 2012; Umezawa, 1974).

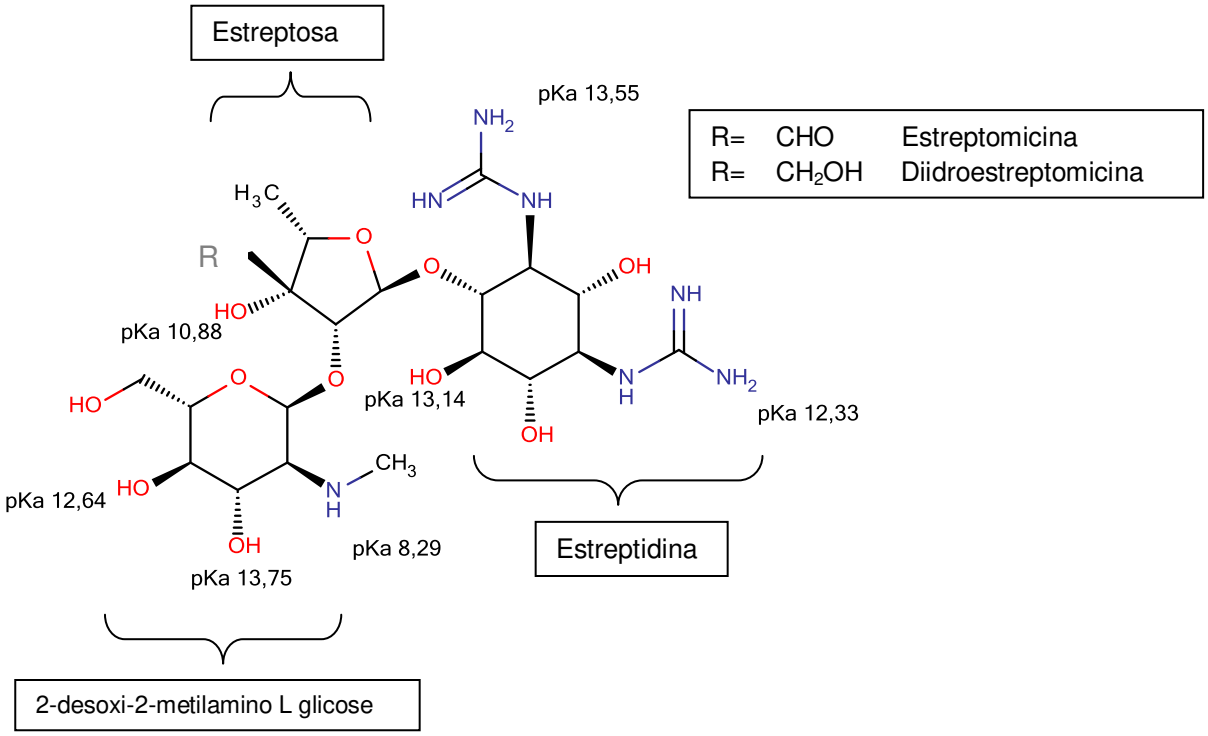

Figura 7. Estrutura química dos aminoglicosídeos estreptomicina e diidroestreptomicina.

A STRE e DHS possuem três grupos amino, protonáveis em soluções aquosas. Dois deles são grupos guanidina básicos. Um dos grupos guanidinos com um pKa 13,55 e o segundo de pKa 12,33. Além disso, a presença na estrutura de um sítio amino secundário também apresenta equilíbrio de ionização com um valor de pKa de 8,29

(**Figura 8**). Estes AG são classificados como os fármacos mais básicos do esquema antimicrobiano, uma vez que a valores de pH menores de 8 apresentam-se como uma molécula triprótica (Orgovan e Noszal, 2012).

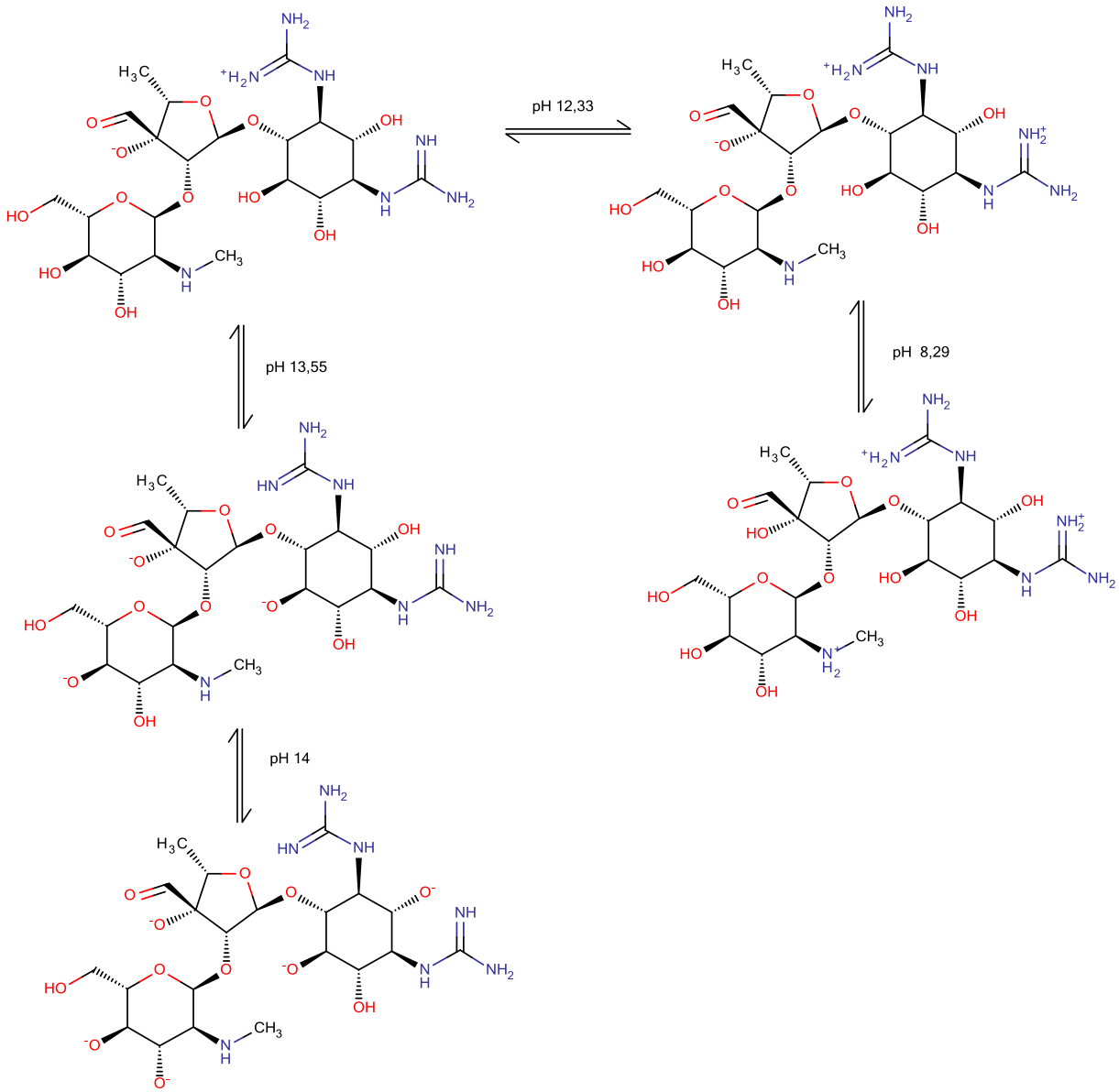

Figura 8. Equilíbrios de protonação do aminoglicosídeo estreptomicina.

A notável basicidade dos AG (STRE e DHS) é atribuída aos grupos guanidinos, os quais tem uma grande estabilização por ressonância da base protonada, resultando em três estruturas equivalentes (**Figura 9**).

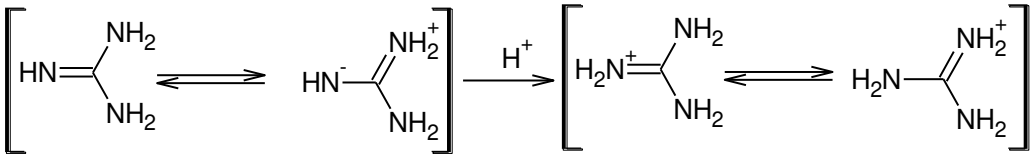

Figura 9. Estruturas de ressonância dos grupos guanidinos.

Da mesma forma, os AG a pH > 12 apresentam ionização dos grupos hidroxila dos açúcares presentes na sua estrutura (estreptidina e N-metil glicosamina). Estes grupos a altos valores de pH se ionizam formando espécies negativamente carregadas (alcoolatos). Em geral as constantes de ionização destes grupos se encontraram na faixa de 10^{-12} a 10^{-14} (**Figura 8**). Estes equilíbrios de ionização permitem a separação dos AG em colunas de troca aniônica, uma vez que nestas metodologias são usadas soluções com um pH entre 13 – 14. Neste intervalo de pH as espécies majoritárias de STRE e DHS contém cargas -3, -4 e -5. No caso dos AG, diferenças sutis na estrutura e nos valores de pKa causam significativas diferenças nas características de retenção. A facilidade de ionização está estreitamente relacionada com o tipo de açúcar presente na estrutura do AG. Os compostos que contém açúcares redutores são mais facilmente ionizáveis do que inositóis e glicosídeos (Alan, 1999).

O uso dos antimicrobianos STRE e DHS é indicado para o tratamento de infecções bacterianas que acometem bovinos, equinos, suínos, ovinos, ovelhas e cabras. São empregadas principalmente no manejo do gado leiteiro para o tratamento de infecções como as mastites e enterites e aquelas decorrentes de: partos difíceis, lesões e hemorragias posteriores à intervenção obstétrica e como suplementos alimentares. Eles são administrados oralmente como aditivos alimentares ou

diretamente por injeção. De modo geral, reduzem as infecções bacterianas intestinais, preservando a integridade da mucosa intestinal e permitindo melhor absorção dos nutrientes, o que resulta em melhor desempenho (SINDAN, 2012).

1.3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINOGLÍCOSIDEOS EM MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO

1.3.1. O estado da arte dos métodos analíticos para a determinação de aminoglicosídeos em medicamentos de uso veterinário

Devido à alta polaridade, caráter iônico e à basicidade dos AG estes compostos são tipicamente determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*) ou eletroforeses capilar.

Entretanto, estes compostos dado sua natureza, não apresentam retenção adequada em colunas de cromatografia de fase reversa, sendo que para sua determinação é muito popular o uso da cromatografia de par iônico (Whall, 1981), usando na fase móvel reagentes de par iônico com carga negativa, tais como pentano-, heptano- ou hexano sulfonatos. Também têm sido empregados ácidos, tais como, o ácido perfluorocarboxílico e o ácido heptafluorobutírico, os quais são adequados para serem usados com detectores de massas que necessitam de compostos voláteis na fase móvel. O mecanismo de retenção dos AG com o uso de alquilsulfonatos é o resultado da interação dos alquilsulfonatos e a carga positiva dos AG protonados (pH ≈ 3), conjuntamente com as interações entre o reagente de par iônico e a fase hidrofóbica da coluna cromatográfica (Inchauspé and Samain, 1984, Isoherranen e Soback, 1999). Não obstante, o uso de cromatografia de par iônico para a separação de AG requer de grandes cuidados no ajuste do pH da fase móvel, pelo qual é recomendado o uso de tampão acetato ou fosfato.

Em adição, os AG não possuem cromóforos, o que inviabiliza a sua detecção pelos métodos cromatográficos de acoplamento com detectores tradicionais como o UV-VIS (UV-VIS - *Ultraviolet–visible spectroscopy*). Diversas estratégias analíticas têm sido reportadas para a separação e determinação de AG em medicamentos, usando a cromatografia líquida associada a diversos detectores.

Assim sendo, métodos empregando detectores universais, tais como o detector de índice de refração, foram empregados, para fins preparativos, para a separação de tobramicina, kanamicina, amicacina, sisomicina, estreptomicina, neomicina e gentamicina (Samain *et al.*, 1987). No entanto, devido à elevada sensibilidade do detector à mudanças na composição da fase móvel e na temperatura, este método de detecção não é adequado para a quantificação dos ativos em medicamentos veterinários na rotina.

O detector universal por espalhamento de luz evaporativo (ELSD- *Evaporative Light Scattering Detecto*r) foi proposto por diversos investigadores para a determinação de STRE e DHS (Douville *et al.*, 2006; Galanakis *et al.*, 2006; Sarri *et al.*, 2006), uma vez que permite a quantificação sem derivatização. Os maiores problemas no uso deste detector são que este requer o emprego de uma fase móvel volátil. Em geral, esse detector não apresenta um comportamento linear numa ampla faixa de trabalho. Contudo, foram relatados aplicações na faixa de 4–50 mg L^{-1}, sendo a resposta uma relação exponencial entre a área do pico e a massa do analito. O método foi aplicado para a determinação de amicacina (formulação injetável) e de tobramicina (gotas oftálmicas e unguentos) em formulações farmacêuticas, sem apresentar efeito matriz e com porcentagens de recuperação de 95,6 a 103,8% (Galanakis *et al.*, 2006) e de 99-103% (Megoulas e Koupparis, 2005), respectivamente e uma precisão intra-ensaio menor do que 2,2%.

Do mesmo modo, a detecção direita dos AG usando UV a baixos comprimentos de onda é possível para alguns aminoglicosídeos, porém, a seletividade destes métodos

nem sempre é adequada (Adams *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 1999; Pyun *et al.*, 2008). Entretanto, a fim de melhorar a detectabilidade e seletividade dos métodos de detecção, tem sido descritos procedimentos de derivatização pós-coluna com ortoftaldeído (OPA) a uma temperatura de 70 °C, para posterior detecção do produto formado por fluorescência ou UV. No entanto, para essas reações de derivatização faz-se necessário o controle rigoroso da temperatura da reação de derivatização, uma vez que pode ocorrer a decomposição do derivado (Vinas *et al.*, 2007). Outro reagente empregado para formação de derivado fluorescente é o 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil-carbamato. No entanto, os valores de precisão deste procedimento em termos de repetitividade (precisão intra-ensaio, RSD 10,8%) e precisão intermediária (precisão inter-ensaio, RSD 10,6%) não foram satisfatórios (Hosokawa *et al.*, 2008). Em adição, estes métodos de derivatização são muito tediosos, consomem muito tempo e não estão isentos de apresentar formação de subprodutos da reação, ou reações incompletas que podem levar a erros na quantificação.

Vários métodos de cromatografia líquida combinados com espectrometria de massa (MS- *Mass Spectrometry*) têm sido reportados como técnica para a determinação de AG (Li *et al.*, 2008; Pendela *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2006). Contudo, apesar do detector ser altamente seletivo e permitir a confirmação de identidade é uma técnica que requer um investimento relativamente alto, o qual não é possível para muitos laboratórios que realizam análises de rotina. Além disso, o uso de sais voláteis na fase móvel é imprescindível, e dependendo da fase estacionária, reagentes de par iônico e tampão para controle de pH se fazem necessários. Não obstante, uma vez que os AG são termolábeis é recomendada a ionização à pressão atmosférica (API-Atmospheric *Pressure Ionization*) (Guo *et al.*, 2006) ou ionização química à pressão atmosférica (APCI- *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*) (Grahek e Zupančič-Kralj, 2009).

Recentemente, foi considerada a determinação de AG com detector corona de aerossol carregado (CAD- *Charged Aerosol Detectors*) (Almeling *et al*., 2012; Holzgrabe *et al*., 2011; Joseph e Rustum, 2010; Stypulkowska *et al*., 2013). Entretanto, quando é empregada a cromatografia em fase reversa também acoplada ao detector CAD, se necessita usar de reagentes par iônico de alto custo; adicionalmente, a faixa linear do detector é bastante estreita e a resposta é uma função quadrática em função da concentração. Ainda, a resposta do CAD é dependente do teor de modificador orgânico sendo que sua resposta varia em função do gradiente da fase móvel, o que limita a sua aplicação.

Alternativa bastante atraente para contornar a falta de cromóforo nos AG é a detecção eletroquímica, usando a técnica de amperometria pulsada (PAD- *Pulsed Amperometric Detection*) (Polta *et al*., 1985). Com este sistema de detecção, Polta e colaboradores conseguiram medir a corrente de oxidação da tobramicina com a aplicação de um potencial triplo sob o eletrodo de trabalho de prata, usando um potencial de determinação de 0,5 V *vs* o eletrodo saturado de calomelano. Porém, dado que o sinal de oxidação dos AG se sobrepõe com o inicio do sinal da formação do óxido de prata (aprox. 0,0 V vs electrodo saturado de calomelano, SCE), alguns autores recomendam o uso de ouro como eletrodo de trabalho em vez da prata. O eletrodo de ouro foi empregado por Statler (Statler, 1990) para a detecção da tobramicina em medicamentos. Para tanto, foi empregada uma coluna de separação de troca aniônica, a qual tem sido comumente usada para determinação de carboidratos, e hidróxido de sódio como fase móvel, uma vez que os AG são aniônicos neste meio. Entretanto, para aumentar a detectabilidade do método foi preciso a adição pós-coluna de solução de hidróxido de sódio (0,25 mol L^{-1}) a fim de elevar o pH e a força iônica aos níveis necessários para a detecção.

A partir destes primeiros estudos, outros métodos foram desenvolvidos usando a cromatografia de par iônico acoplada a detecção amperométrica para os AG neomicina (Adams *et al*., 1996), kanamicina (Adams *et al*., 1997), netilmicina (Adams

et al., 1998) e tobramicina (Szúnyog *et al.*, 2000), incluindo recentes estudos efetuados com sucesso, para a determinação simultânea de quatro aminoglicosídeos: vertilmicina, micronomicia, etimicina e sisomicina (Wang *et al.*, 2007). Nestas publicações, foi relatada a aplicação de pulsos em três potenciais: E_1= 0,05 V, E_2= 0,75, E_3= -0,15V, com uma duração de pulso de t_1:0–0,40 s, t_2: 0,41–0,60 s, e t_3: 0,61–1,00 s e com um tempo de integração de 0,2 s. Além disso, em cada um destes trabalhos foram avaliadas diversas colunas cromatográficas: de fase reversa poliméricas e à base de sílica, e foi otimizada a composição da fase móvel (reagente de par-iônico, solvente orgânico e pH). As seleções dos reagentes e das condições analíticas são fundamentais para diminuir o efeito de passivação da superfície do eletrodo. Embora, a sequência de potenciais, teoricamente, deveria manter ativa a superfície do eletrodo, os autores verificaram que seria necessário polir a superfície do eletrodo de ouro após 40 análises para manter a repetitividade das medições (Adams *et al.*, 1997). Não obstante, os autores concluíram que na prática este modo de detecção requer o controle preciso dos potenciais aplicados, uma vez que variações destes podem levar a falta de repetibilidade dos resultados.

Adams e colaboradores não tiveram sucesso no uso da detecção eletroquímica para análise de amostras de medicamentos contendo STRE e DHS (Adams *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 1999). Eles tentaram reproduzir as condições otimizadas (parâmetros de separação e detecção) para os outros AG previamente avaliados, entretanto eles obtiveram uma baixa eficiência e simetria do pico não adequada. Os autores tentaram contornar esses problemas com o uso de gradiente na fase móvel e adição de modificadores orgânicos. No entanto, esta modificação acarretou na perda de repetitividade na resposta do detector, provavelmente devido à adsorção do modificador orgânico na superfície do eletrodo. Em decorrência destes resultados, os autores recomendam para a determinação de STRE e DHS em formulações farmacêuticas a cromatografia de par iônico com detecção UV a baixos comprimentos de onda, em vez do detector amperométrico.

Uma vez que os resultados apresentados por Adams e colaboradores não foram promissores, pode se concluir que se faz necessário uma reavaliação dos parâmetros de detecção, no caso específico destes dois analitos (STRE e DHS). Uma nova abordagem foi publicada por Long e colaboradores (Long *et al.*, 2005) onde foram fixados valores de potencial de E_1= -0,1 V, E_2=-0,75 V e E_3=0,15 V, com uma duração de pulso de t_1: 0,05s, t_2: 0,005 s e t_3: 0,005 s, e um tempo de integração de 0,02 s. A diferença neste trabalho em relação ao de Adams e colaboradores foi em relação à limpeza da superfície eletródica que foi realizada mediante aplicação de um potencial negativo em vez do positivo. Os autores reportam uma repetibilidade para 30 medidas sucessivas para a STRE de 5,8%.

Hanko e Rohrer inovaram com a aplicação do pulso de quatro potenciais para a determinação de STRE e DHS (Hanko e Rohrer, 2007), baseados em métodos anteriormente descritos para a determinação de neomicina e gentamicina (Cai e Mou, 2005; Ding *et al.*, 2004). Nesta nova forma de pulso, é aplicado um potencial negativo (−2,0 V) de limpeza da superfície do eletrodo. Os resultados apresentados pelos autores mostram que o método atinge os parâmetros mínimos de desempenho do método cromatográfico: assimetria do pico para STRE de 1,25, eficiência de 2216 (número de pratos) e precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio de 1,92% e 8,34% (estimativa do desvio padrão relativo), respectivamente.

1.3.2. MÉTODOS DE DETEÇÃO ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS

1.3.2.1. Mecanismo da oxidação de aminoglicosídeos nos eletrodos de metais nobres

A detecção eletroquímica acoplada à cromatografia líquida é uma técnica eficaz para a determinação de compostos que contém grupos eletroativos. A célula de detecção

amperométrica é tipicamente composta por um eletrodo anódico sólido (ouro, prata, carbono vítreo ou diamante), um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar. Nos casos onde um potencial constante é aplicado a técnica de detecção denomina-se amperometria DC (DC-*direct current*). Neste modo de detecção, numerosos compostos aromáticos (fenóis, aminofenóis, catecolaminas e outras aminas metabólicas) podem ser detectados facilmente por reações anódicas, uma vez que a barreira de ativação da reação eletroquímica é relativamente baixa, devido à presença de elétrons ressonantes nestes compostos aromáticos que permitem a estabilização dos produtos intermediários do processo de oxidação. Em consequência, na detecção por amperometria DC, o eletrodo anódico usado pode ser inerte e capaz de aceitar ou doar elétrons para o analito de interesse (LaCourse e Dasenbrock, 1998).

No entanto, os carboidratos e AG não exibem resposta sob eletrodos de carbono vítreo, uma vez que a ausência de elétrons π- ressonantes nestes compostos faz com que as taxas de oxidação sejam muito baixas, embora as reações possam ser termodinamicamente favorecidas. Considerando que o mecanismo de estabilização eletrônica inerente não existe para os compostos alifáticos polares, a estabilização dos radicais livres intermediários só pode ser conseguida através da adsorção destes compostos na superfície dos eletrodos de metais que têm orbitais d livres, tais como prata ou ouro. Neste caso, a superfície do eletrodo tem participação direta no mecanismo de oxidação, beneficiando os processos faradaícos. De modo geral, esses processos são eletrocatalíticos. Infelizmente, uma das consequências indesejáveis do processo de adsorção é o envenenamento do eletrodo pelo acúmulo dos produtos de reação, resultando na perda gradual da resposta do eletrodo (LaCourse e Dasenbrock, 1998).

A atividade catalítica dos eletrodos de prata e ouro na oxidação de carboidratos e AG já foi estudada por diversos autores (Pasta *et al.* 2010). Foi constatado que o efeito catalítico do eletrodo de ouro, frente à oxidação da glicose, somente é conseguido

em meio alcalino. Esse fato somente pode ser explicado pela formação de uma camada de hidróxido de ouro (AuOH) em meio fortemente básico, por quimiosorção dos íons hidróxidos na superfície do eletrodo. Adicionalmente, esta camada também pode ser formada por adsorção de radicais hidroxilas produzidos por redução da água, na faixa de -0,5 a +0,1 V vs. SCE (Vassilyev *et al.* 1985). Os autores consideram que os hidroxilas radicais ($OH^{\cdot}$) são adsorvidas em sítios de alta coordenação na superfície do metal, isto é, nos defeitos ou deslocamentos de sua superfície (Johnson e Lacourse, 1995). Além disso, tem sido estabelecido uma grande dependência entre a taxa de formação do catalisador AuOH e o fluxo de OH transportado para a superfície do eletrodo.

De modo geral, segundo Johnson e Larew (Larew e Johnson, 1989) as etapas envolvidas no mecanismo de oxidação de carboidratos e AG em soluções alcalinas no eletrodo de ouro são as apresentados na **Figura 10**. O modelo foi delineado para a molécula de glicose. É postulado que em meio básico os sítios catalíticos (espécies radicais OH adsorvidas na superfície do eletrodo) estão suficientemente perto um do outro para interagir mediante ligações de hidrogênio com os grupos hidroxilas e o aldeído presentes na estrutura de carboidrato, sendo que o número de sítios deve ser maior do que o número de moléculas de analito perto da superfície, para permitir que a molécula interaja com mais de um sitio catalítico.

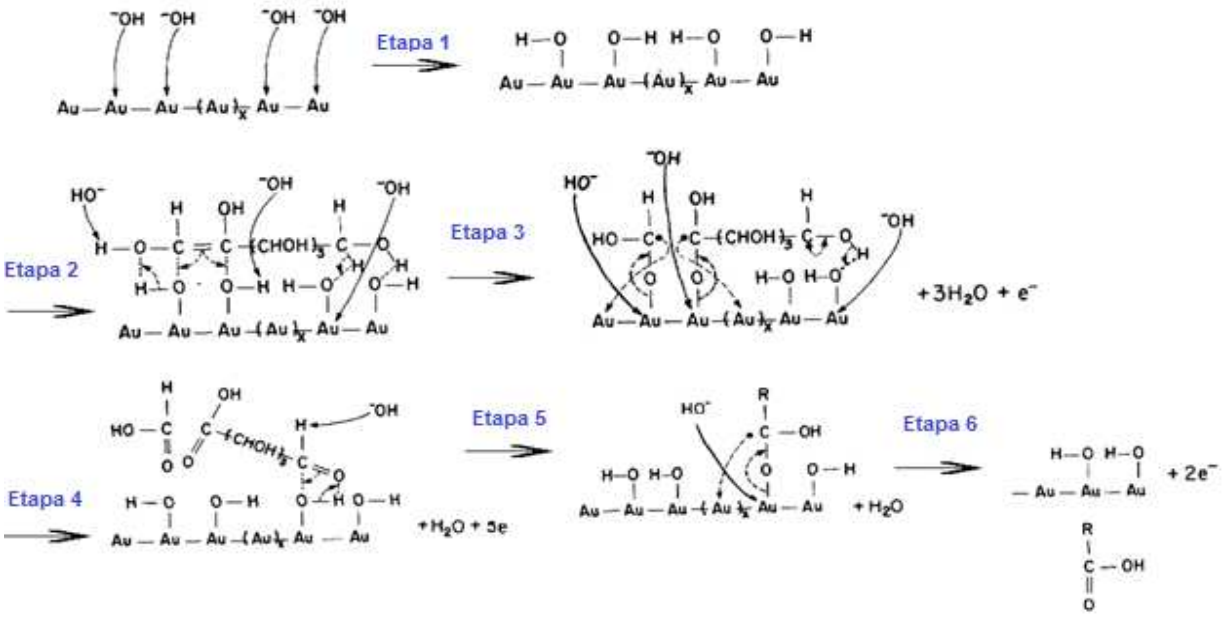

Figura 10. Mecanismo de oxidação da glicose no eletrodo de ouro em meio alcalino (adaptado de Larew e Johnson, 1989).

Como mostrado na **Figura 10**, a etapa 1 do mecanismo de oxidação da glicose no eletrodo de ouro, proposto pelos autores, representa a formação do AuOH, que acontece a potenciais aprox. -0,75 V. A etapa 2 consiste na adsorção e concomitante emparelhamento da conformação enediol da glicose com quatro sítios AuOH. De fato todas as conformações estão envolvidas no processo, mas com base nos relatos da literatura, o enediol parece ser um intermediário primário envolvido no mecanismo, o qual é adsorvido preferencialmente nos sítios catalíticos do AuOH a potenciais aprox. -0,75 V. A etapa 3 envolve a desidrogenação e formação do radical de glicose, juntamente com a divisão da ligação entre átomos de carbono. Sem dúvida todos estes processos não ocorrem simultaneamente, no entanto são ilustrados como uma única etapa apenas para facilitar o entendimento, destacando que nesta etapa do processo de oxidação os íons OH^- são requeridos para neutralizar os prótons gerados durante a desidrogenação. As etapas 4 a 6 envolvem a transferência de elétrons a partir dos radicais até os sítios descobertos na superfície do metal (Au), concomitantemente com a transferência dos oxigênios da superfície para o hidrato de carbono adsorvido e a regeneração as espécies AuOH (Makovos e Liu, 1986; Nikolaeva *et al.*, 1983; Pasta *et al.*, 2010; Vassilyev *et al.*, 1985).

1.3.2.2. Detecção amperométrica pulsada

Mesmo para os pares redox reversíveis a amperometria DC muitas vezes requer a limpeza mecânica da superfície eletródica para remoção de compostos adsorvidos, o que requer necessariamente a desmontagem da célula de detecção. Para evitar isso, muitas vezes são combinados processos químicos e/ou eletroquímicos de limpeza "*on-line*", a fim de manter a repetibilidade na resposta dos eletrodos. Com esta finalidade, foi desenvolvida a técnica de detecção amperométrica pulsada PAD (Hughes *et al.*, 1981).

O processo PAD é baseado na dissolução das camadas de óxidos das superfícies eletródicas de metais nobres como prata e ouro, pela aplicação alternada de potenciais positivos e negativos. As superfícies livres de óxido têm afinidade de adsorver compostos orgânicos (Suresh e William, 2002).

Tradicionalmente, a escolha dos valores dos potenciais a serem aplicados na PAD tem sido baseada na resposta da voltametria cíclica (CV- *Cyclic Voltammetry*). No entanto, a CV não proporciona informações de parâmetros tais como tempo de aplicação dos potenciais, de maneira que estes são determinados, geralmente, a partir dos cromatogramas (áreas ou altura dos picos) no sistema de HPLC-PAD.

1.3.2.2.1. Potencial de onda triplo na detecção amperométrica

O potencial de onda triplo (**Figura 11)** consiste na aplicação de um potencial E_1 que permite a oxidação eletrocatalítica do analito. Neste potencial é integrada a corrente faradaíca durante um período de tempo (t_{det}). No entanto, uma vez que durante esse processo catalítico podem ser acumulados resíduos na superfície do eletrodo, é necessária a aplicação um potencial mais positivo E_2 do que o primeiro para

promover a dessorção oxidativa dos compostos da superfície do eletrodo, mediante formação de uma camada de óxido do metal (i.e., AuO e PtO). As evidencias segundo os autores indicam que a taxa de limpeza oxidativa da superfície pode ser acelerada, mediante aplicação de potenciais tão altos que permitem a evolução de oxigênio. No entanto, de modo geral o potencial empregado é em torno de +0,75 V. Neste potencial é evitada a formação de bolhas resultantes da oxidação da água, as quais podem aderir à superfície do eletrodo e interferir no transporte de massa do analito para o eletrodo. Finalmente, o óxido do metal formado na superfície por aplicação do potencial E_2 (AuO) é considerado inerte, e deve ser catodicamente dissolvido, por uma aplicação de um potencial negativo E_3, em torno de -0,3 V (Suresh e William, 2002). A remoção do óxido previamente formado permite a reativação do eletrodo e a pré-adsorção do analito para o ciclo seguinte.

Cabe destacar que se ainda tiver óxido (AuO) na superfície do eletrodo, ao aplicar o potencial E_1, este vai provocar uma contribuição significativa para a resposta residual, e esta resposta é sensível a variações de temperatura e pH. Assim, em HPLC-PAD os resultados obtidos em condições de redução incompleta do óxido, levam a sinais de linha de base instáveis. Outra consequência da remoção incompleta do óxido é uma diminuição do sinal analítico, uma vez que a superfície do eletrodo não é totalmente utilizada no processo de detecção (Johnson e Lacourse, 1995; LaCourse e Johnson, 1993).

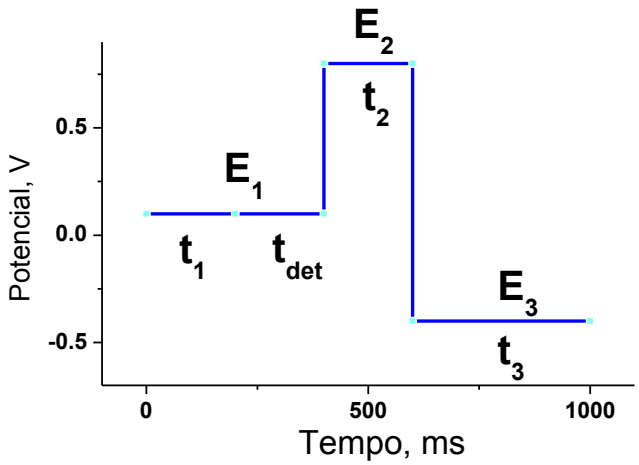

Figura 11. Forma do pulso de três potenciais para a detecção amperométrica de AG e carboidrato.

1.3.2.2.2. Detecção amperométrica por aplicação do pulso de quatro potenciais

Uma grande desvantagem da abordagem do potencial de onda triplo na detecção amperométrica é o fato que esta requer valores de potencial de limpeza oxidativa relativamente altos por um longo período de tempo, o que implica em uma excessiva formação de óxido de ouro na superfície, causando uma dissolução do próprio ouro do eletrodo. Em consequência, ocorre uma diminuição na detectabilidade e na repetibilidade dos resultados (Rocklin *et al.*, 1998).

Contudo, para evitar a dissolução de ouro, alguns autores propõem uma outra forma de aplicação de potencial (Jensen e Johnson, 1997), na qual os produtos da oxidação adsorvidos na superfície podem ser removidos do eletrodo por aplicação de potenciais negativos em vez de potenciais positivos. Assim, baseados nestas afirmações Rocklin e colaboradores (Rocklin *et al.*, 1998) sugerem um pulso de quatro potenciais para a detecção de carboidratos (**Figura 12**), que permite manter uma resposta constante, minimizando a dissolução do eletrodo e melhorando, assim, a repetibilidade do sinal.

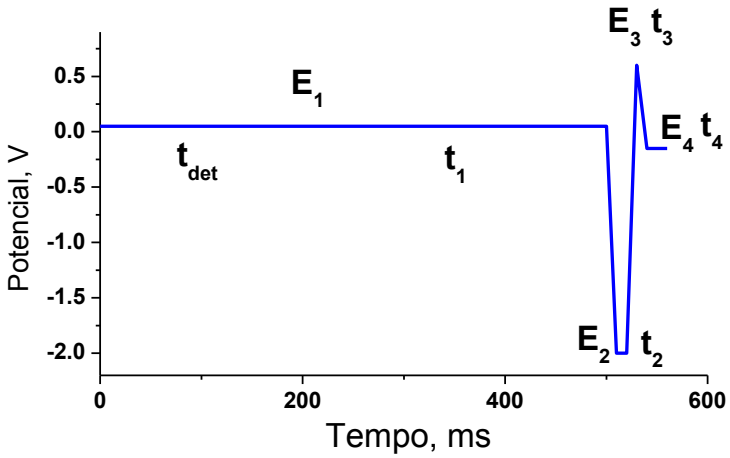

Figura 12. Forma do pulso de quatro potenciais para a detecção amperométrica de AG e carboidratos.

Cada um dos quatro potenciais mostrados na **Figura 12** desempenha uma função diferente. O primeiro potencial (E_1) é o potencial de detecção na qual a corrente de oxidação dos analitos é integrada. O potencial de limpeza (E_2), que consiste na aplicação de altos potenciais redutivos; nesta condição podem ser deslocadas as moléculas adsorvidas na superfície pela produção de hidrogênio proveniente da redução da água. Em geral, os autores recomendam um potencial de -2,0 V para realizar a limpeza eficaz, sem gerar ruído excessivo do sinal. Em seguida, é necessária a aplicação de um terceiro potencial E_3= 0,6 V, denominado de potencial de ativação, cujo propósito é criar sítios catalíticos no eletrodo de ouro, isto é, sítios com átomos de baixa coordenação (Burke *et al.*, 2002; Burke *et al.*, 1994). Assume-se que estes sítios catalíticos são criados através da formação e redução de óxido na superfície. Estudos evidenciariam que a omissão deste passo de ativação, leva a uma diminuição rápida da resposta do detector. Uma possível explicação para isto é a eliminação de sítios ativos durante a redução exaustiva da superfície do ouro por meio de um mecanismo do tipo de reconstrução. Finalmente, se faz necessário a aplicação de um potencial de redução (E_4), geralmente em torno de -0,1 V para reduzir o óxido formado previamente. Este valor de potencial escolhido consegue reduzir o óxido sem reduzir o oxigênio dissolvido, o que melhora a estabilidade da linha de base. (Cai e Mou, 2005; Ding *et al.*, 2004).

1.3.2.2.3. Detecção amperométrica por aplicação do pulso de seis potenciais

Recentemente, Clarke e colaboradores (Clarke *et al.*, 1999) apresentaram uma forma de pulso de seis potenciais para a detecção amperométrica de aminoácidos e amino açúcares. Sendo que, ao contrário do pulso de quarto potenciais, neste caso o potencial durante o qual é integrada a corrente faradaica, que é correspondente à oxidação do analito, não é mantido constante, mas sim varrido entre um potencial E_2= -0,05 V e um valor de E_3= 0,28 V de potencial (**Figura 13**). Esta modificação traz benefícios uma vez que os grupos aminos e o ouro sofrem oxidação simultânea a altos valores de potencial. Entretanto, o óxido de ouro formado durante o potencial maior (E_3= 0,28 V) é reduzido durante o potencial mais baixo (E_4= -0,05 V) e, uma vez que a oxidação do ouro é reversível e a oxidação dos grupos aminos é irreversível, a contribuição para o sinal a partir da oxidação de ouro é largamente anulada.

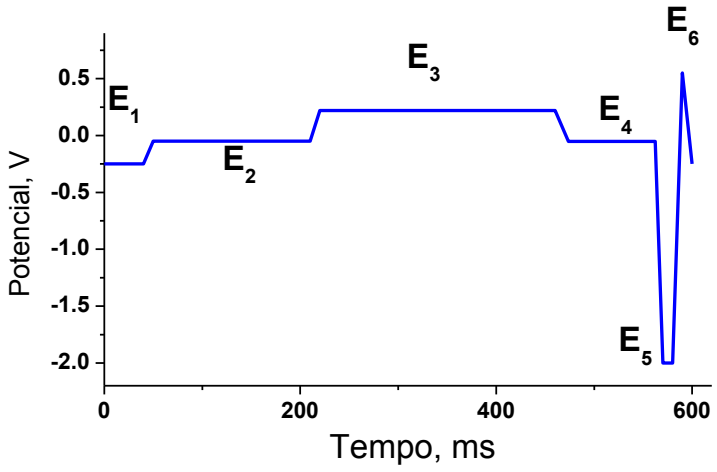

Figura 13. Forma do pulso de seis potenciais para a detecção amperométrica de AG.

O potencial E_1 é aplicado a fim de adsorver os aminoácidos na superfície, sendo que este potencial é usualmente negativo (E_1). No entanto, uma vez que a sensibilidade

para os aminoácidos não adsorvidos não é aumentada, o resultado pode ser uma divergência de fatores de resposta, pois tem sido observado que a intensificação da adsorção usualmente causa uma diminuição da faixa linear para os aminoácidos mais básicos. Os passos de limpeza (E_5) e ativação (E_6) são os mesmos aplicados com um pulso de quatro potenciais.

1.4. MÉTODOS FARMACOPEICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS EM MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO

As Farmacopeias são os códigos oficiais farmacêuticos de cada país, onde estão definidos os parâmetros mínimos necessários para o controle da qualidade dos insumos utilizados na fabricação de todas as formas farmacêuticas, até a embalagem final. Essas especificações regulam as relações com o comércio exterior (importação e exportação), servindo, ainda, como parâmetro para as ações da vigilância sanitária, como o registro e a análise fiscal.

Embora, os países não são obrigados a elaborar farmacopeias e podem adotar de outros países, o Brasil conta com uma farmacopeia nacional (Farmacopeia Brasileira) a qual reflete o avanço da ciência e da tecnologia do país.

Cabe destacar que a Farmacopeia Brasileira na sua 5ª edição (Farmacopeia Brasileira, 2010) propõe em geral métodos de espectrofotometria no ultravioleta-visível e ensaios microbiológicos para a determinação dos antimicrobianos AG. Porém, esta ainda carece de monografias específicas para a determinação de AG em formulações farmacêuticas e, principalmente, não contempla formulações de uso veterinário. Nesta farmacopeia existe apenas uma monografia que contempla o doseamento do sulfato de estreptomicina em solução injetável e em pó estéril para ser reconstituído em água para injeção, indicando os limites de aceitação de no

mínimo 90,0% e no máximo 115,0% da quantidade declarada no rótulo do medicamento**.** A Farmacopeia Britânica (British Farmacopeia, 2011) tem uma secção exclusiva para formulações veterinárias e propõe métodos de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção espectrofotométrica a 205 nm, para a determinação destes compostos. As farmacopeias Japonesa (Japanese Pharmacopoeia, 2011) e Europeia (European Pharmacopoeia, 2012) propõem ensaios de identificação usando cromatografia em camada delgada e quantificação dos ativos mediante ensaios microbiológicos.

Em contrapartida, o método estabelecido pela Farmacopeia Americana (USP, 2010) recomenda o uso de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD- *High-performance liquid chromatography - Pulsed Amperometric Detection*) para a quantificação de STRE. O método descrito consiste no uso de uma coluna de separação cromatográfica de troca aniônica, uma fase móvel de NaOH 0,07 mol L^{-1} e especifica um pulso de detecção amperométrico de quatro potenciais (E_1= 0,1 t_1= 400 ms, E_2= -0,2 t_2= 20 ms, E_3= 0,6 t_3= 10 ms, E_4= -0,1 t_4= 60 ms). No entanto, para a DHS ainda propõem o uso de ensaios microbiológicos para antibióticos como método para determinação de aminoglicosídeos em formulações farmacêuticas. Os parâmetros de conformidade estabelecidos pela Farmacopeia Americana (USP, 2010) para a determinação de STRE com seus respectivos critérios de aceitação são: resolução superior a 2,5, número de pratos superior a 1000 e fator de assimetria inferior a 2.

1.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O objetivo da validação é de garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões.

A maioria dos órgãos reguladores do Brasil e de outros países exige a validação de métodos analíticos e, para isso, tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado.

Em geral, os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. No entanto, de modo geral, os protocolos não são harmonizados. Citando o Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos para determinação de fármacos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO). Com isso, e apesar da existência dos guias de validação da ANVISA e do INMETRO, recentemente o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) publicou um Guia de Validação e Controle da Qualidade Analítica para Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários. Este guia será seguido neste trabalho, a fim de avaliar se o método desenvolvido atinge todos os parâmetros de qualidade estabelecidos pelo mesmo.

1.5.1. Parâmetros analíticos para validação de métodos, proposto no guia do MAPA

A validação do método proposto neste trabalho foi realizada baseada no “Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica de Medicamentos Veterinários e Fármacos em Produtos para Alimentação Animal” do MAPA publicado na portaria N° 577 MAPA em 2011 (MAPA, 2012). Este guia de validação além de sua função orientativa, estabelece os requisitos analíticos mínimos que devem ser observados na validação e na rotina analítica dos laboratórios que integram ou desejam integrar a rede brasileira de laboratórios agropecuários, na área de medicamentos

veterinários e produtos afins. Entretanto, quando são usados procedimentos normalizados como os farmacopêicos e outros oficializados pelo MAPA , o guia recomenda fazer só uma verificação de desempenho que consiste basicamente em uma avaliação dos critérios de veracidade/ recuperação e precisão, desde que não seja feita nenhuma alteração nos procedimentos, especificações e técnica analítica descritas na norma. Mas, no caso do desenvolvimento de um novo método é preciso uma completa avaliação dos indicadores do escopo e do desempenho tais como: seletividade, faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão (inter- e intra- ensaio), exatidão e robustez. Esclarecendo que, no presente trabalho a finalidade do método é ser um teste quantitativo para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas este não requer a determinação do limite de detecção nem o de quantificação.

1.5.1.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade do método em descriminar o analito entre outros compostos que podem estar presentes no medicamento. Segundo o guia de validação isto pode ser avaliado pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais.

1.5.1.2. Efeito matriz

O Guia de Validação do MAPA (MAPA, 2012) articula que o efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral, as quais podem causar diminuição ou ampliação do sinal analítico.

Este guia recomenda para a avaliação deste parâmetro o uso do extrato da matriz branca. No caso da indisponibilidade de amostras brancas para a obtenção do extrato da matriz branca, o Guia recomenda o emprego do método adição de padrão. Para avaliar o efeito deve ser realizada uma comparação estatística da concentração do analito obtido mediante uma curva no solvente com o obtido em uma curva adição de padrão no medicamento. O teste *F*, de homogeneidade de variâncias, deve ser aplicado para verificar se as variâncias das amostras podem ser consideradas estatisticamente iguais. Sendo as variâncias das amostras estatisticamente equivalentes, os desvios-padrão desses dois grupos de análise podem ser agrupados e a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras deverá ser testada com a distribuição *t* de *Student*. Dessa forma, para aceitação da não existência de efeito matriz as médias dos dois conjuntos de amostras analisadas deverão ser estatisticamente iguais.

1.5.1.3. Curva analítica, linearidade e sensibilidade

Segundo o Guia do MAPA (MAPA, 2012), a linearidade é a capacidade do método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro da faixa linear da curva analítica. Este guia não recomenda um intervalo para a faixa linear, apenas recomenda que a concentração esperada (teor do princípio ativo no medicamento) para a amostra de ensaio deve se situar em torno do centro da curva analítica. No entanto, o Guia indica que a curva analítica seja composta de no mínimo, cinco níveis de concentrações, e que cada nível de concentração deve ter sua solução preparada independentemente no mínimo por três vezes.

Em adição o Guia de Validação do MAPA faz referência a um tratamento estatístico detalhado e rigoroso para avaliação da linearidade do método. Inicialmente os *outliers* devem ser avaliados pelo teste residual de Jacknife (J_{ei}). Este teste usa uma estimativa do desvio padrão de pontos independentes. Assim, os resíduos são

facilmente calculados para cada ponto sem ter que adequar *n* regressões separadas, excluindo cada um dos pontos. Os resíduos de Jacknife são distribuídos como a distribuição *t*. Valor de J_{ei} maior do que o valor *t* crítico é considerado *outlier*. Para cada dado eliminado, o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) deverá ser realizado novamente (de Souza e Junqueira, 2005).

Ainda, o Guia também exige avaliar se em cada ponto de dados na faixa tem uma variação absoluta constante (homocedasticidade). Para isso, o teste de Levene pode ser utilizado, o qual permite confrontar a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos da regressão não diferem entre si (há homocedasticidade). A hipótese nula é rejeitada quando o parâmetro estatístico t_L calculado for maior que o *t* crítico. Uma vez confirmada a homocedasticidade, pode se estabelecer a equação da reta empregando o método dos MMQO.

A sensibilidade é um parâmetro que descreve como a resposta varia em função da variação da concentração do analito. Pode ser expressa pelo coeficiente angular da reta obtida a partir da regressão linear da curva analítica.

1.5.1.4. Precisão

Segundo o Guia do MAPA (MAPA, 2011) a precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Sendo que, pode ser estimada em três níveis: repetitividade (precisão intra-ensaio), precisão intermediária (precisão inter-ensaio) e reprodutibilidade. Para a validação de métodos em um único laboratório, que é o enfoque neste trabalho, apenas os dois primeiros níveis são relevantes para este parâmetro.

Conforme o Guia de Validação do MAPA (MAPA, 2011) para se determinar a precisão intra-ensaio deverá ser usado o método de adição de padrão, caso não se disponha de amostras brancas. Assim, a curva de adição de padrão deverá ter no mínimo cinco níveis de concentração e ser realizada, em pelo menos, seis réplicas independentes. A precisão inter-ensaio deve ser realizada da mesma maneira que a precisão intra-ensaio em pelo menos mais duas vezes em dias diferentes. Neste caso, a precisão é expressa como a estimativa do desvio padrão relativo (RSD) da concentração calculada mediante cada uma das curvas de adição de padrão. No caso de análises repetidas de uma amostra em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, o RSD da média não deve exceder aos valores calculados pela Equação de Horwitz, a qual leva em consideração a concentração do analito. Em condições de repetitividade, o RSD deve tipicamente situar-se abaixo de dois terços deste valor.

1.5.1.5. Exatidão

O Guia de Validação do MAPA (MAPA, 2011) retrata exatidão como veracidade/recuperação. A veracidade é definida como a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. Dessa forma, a determinação da veracidade deve ser feita por ensaios de recuperação, utilizando material de referência certificado. Caso não haja esse material, a determinação da recuperação deve ser feita por intermédio de matriz branca fortificada. No entanto, este Guia não relata outros procedimentos alternativos caso não haja nem o material de referência certificado e nem a matriz branca. A faixa de aceitação da veracidade/recuperação varia de acordo com a concentração do analito e leva em consideração a Equação de Horwitz.

1.5.1.6. Robustez

O estudo da robustez de um procedimento analítico procura avaliar o quão sensível o resultado analítico é frente a variações nas condições experimentais do procedimento analítico. O teste de robustez deve ser realizado utilizando a abordagem clássica variando um fator de cada vez ou utilizando a abordagem do planejamento fatorial completo ou fracionário (teste de Youden), a fim que todas as possíveis variações das condições experimentais, que podem ocorrer durante a rotina analítica, devem estar respaldadas pelos estudos de robustez do procedimento analítico e seus efeitos estimados.

1.5.1.7. Incerteza de Medição Analítica

A incerteza é a principal característica metrológica do resultado de uma medição, este valor caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando e pelo tanto sempre deve ser relatada juntamente com todo resultado de medição.

A incerteza final do resultado de uma medição é obtida da combinação das incertezas de múltiplas fontes, e é chamada de incerteza padrão combinada. As fontes que mais contribuem para a incerteza combinada do resultado analítico são:

- As incertezas de amostragem, subamostragem e de preparo de amostras de análise;
- A incerteza de reprodutibilidade ou de precisão intermediária;
- A incerteza relacionada com a estimação da recuperação,
- A incerteza de previsão da curva de calibração do instrumento de medição analítica.

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho visou o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de medicamentos de uso veterinário contendo estreptomicina e diidroestreptomicina, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por amperometria pulsada (HPLC-PAD), com eletrodo de trabalho de ouro.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o comportamento eletroquímico dos aminoglicosídeos estreptomicina e diidroestreptomicina, no eletrodo de ouro, usando para tanto a voltametria cíclica.

- Otimizar os parâmetros do pulso amperométrico para a detecção eletroquímica dos aminoglicosídeos estreptomicina e diidroestreptomicina no eletrodo de ouro.

- Desenvolver e otimizar o método HPLC-PAD para determinação dos aminoglicosídeos em medicamentos veterinários e validar o método conforme o Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica para Medicamentos Veterinários e Fármacos em Produtos para Alimentação Animal do Ministério da Agricultura e Pecuária do Brasil (MAPA, 2011).

- Analisar amostras de medicamentos veterinários contendo estreptomicina e diidroestreptomicina, em formulações injetáveis, pó para injetável e unguento, avaliando se os produtos estão em conformidade com a legislação vigente.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REAGENTES, SOLVENTES E PADRÕES

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau de pureza analítica. Os solventes utilizados foram de grau HPLC e no preparo de soluções foi utilizada água purificada em sistema Milli-Q - 18,2 MΩ cm (Millipore, EUA). As soluções e solventes foram filtrados em filtros de membrana de 0,45 µm, acoplados a filtros de seringa ou sistema de filtração (Millipore, EUA), respectivamente.

Os padrões analíticos dos aminoglicosídeos foram: sulfato de estreptomicina potência 758 µg mg^{-1} (Sigma-Aldrich, EUA), sulfato de diidroestreptomicina (Sigma-Aldrich, 98%,) e glicose (Sigma-Aldrich, 99%).

3.2. EQUIPAMENTOS

Para os estudos eletroquímicos (voltametria cíclica) foi utilizado um Potenciostato – Galvanostato AUTOLAB® PGSTAT 30 (ECO CHEMIE – Holanda) com sistema de 3 eletrodos: eletrodo de trabalho de ouro (2 mm de diâmetro); eletrodo de referência de Ag/AgCl, KCl (sat) e eletrodo auxiliar de platina. A aquisição dos dados e o gerenciamento do potenciostato foram realizados por um microcomputador e mediante programa computacional GPES (Holanda). Para a realização dos experimentos foi utilizada uma cela de vidro Pyrex®, com capacidade de 10 mL, equipada com uma tampa em Teflon® contendo orifícios para desoxigenação da solução com nitrogênio e para o posicionamento dos eletrodos.

As análises cromatográficas foram realizadas empregando um equipamento modular 871 Advance Bioscan para cromatografia líquida de íons de alta eficiência (Metrohm, Suíça), composto por uma bomba 709 IC pump (Metrohm, Suíça) de duplo pistão com tubulações de PEEK, com uma válvula de injeção e alça de amostragem de 20 µL; um detector eletroquímico equipado com uma célula amperométrica do tipo *wall jet* (volume do detector de 0,7 µL) com um eletrodo de trabalho de ouro (8,32 mm de diâmetro), um eletrodo do referência de tipo sólido (patenteado pela Metrohm) e um eletrodo auxiliar de aço inox. O detector amperométrico no modo de trabalho pulsado foi a técnica electroquímica aplicada para efetuar a quantificação. A aquisição de dados foi realizada mediante software IC Net (Metrohm, Suíça).

Para a desgaseificação da fase móvel foi utilizado um banho de ultra-som modelo USC 700 (UNIQUE THORTON, Brasil).

Os padrões analíticos e as amostras de medicamentos veterinários foram pesados em uma balança analítica Sartorius modelo CPA 225D (Alemanha), com precisão de ± 0,01 mg.

3.3. MATERIAIS

3.3.1. Colunas cromatográficas

A coluna empregada neste trabalho foi de troca aniônica CarboPac^{TM} PA1 250 x 4 mm D.I. (Dionex, EUA) e uma coluna de guarda CarboPac^{TM} PA1 50 x 4mm D.I. (Dionex, EUA), ambas com um substrato 10 µm de diâmetro (2% de poliestireno entrecruzado com divinilbenzeno) com látex micro-esferas (Microbead^{TM}) de 500-nm (5% reticulado) funcionalizado com um sal quaternário de amônio altamente estável no pH de 0-14.

3.3.2. Amostras

Foram adquiridas no comércio nacional 16 amostras de medicamentos veterinários, de 5 diferentes empresas (denominadas de A,B,C, D e E), contendo os princípios ativos STRE e/ ou DHS associados ou não, entre outros, com a penicilina G procaínica, penicilina G benzatínica, penicilina G sódica, isonizaida, prednisolona, e/ou piroxicam. A **Tabela 1** apresenta as amostras analisadas e o tipo de formulação.

Tabela 1. Informações básicas sobre as amostras de medicamentos veterinários analisados.

Amostras	Formulação	Princípio ativo principal	Empresa Farmacêutica	Compostos Associados	Concentração Nominal,
1-STRE	Pó Solúvel	Estreptomicina	A	Benzilpenicilina Procainica-Potássica, Isoniazida e Prednisolona.	270 g kg^{-1}
2-STRE			A		270 g kg^{-1}
3-DHS	Pó Solúvel	Diidroestreptomicina	B	Benzilpenicilina Sódica, Penicilina G Clemizolo, Maleato de Ergometrina, Vitamina K3 e Defilina	538 g kg^{-1}
4-STRE/DHS	Pó Solúvel	Estreptomicina e Diidroestreptomicina	C	Benzilpenicilina Procainica-Potássica e Benzatinica, Acetonido de Triancinolora	213 g kg^{-1}
5-STRE/DHS			C		213 g kg^{-1}
6-DHS	Suspensão Injetável	Diidroestreptomicina	D	Benzilpenicilina Procainica, Piroxicam e Procaina	80 g L^{-1}
7-DHS			D		80 g L^{-1}
8-STRE	Unguento intramamário	Estreptomicina	E	Fenoximetilpenicilina-Potássica e Piroxicam	7 g kg^{-1}
9-STRE			E		7 g kg^{-1}
10-STRE			E		7 g kg^{-1}
11-STRE			E		7 g kg^{-1}
12-STRE			E		7 g kg^{-1}
13-STRE			E		7 g kg^{-1}
14-STRE			E		7 g kg^{-1}
15-STRE			E		7 g kg^{-1}
16-STRE			E		7 g kg^{-1}

STRE: Estreptomicina; DHS: Diidroestreptomicina.

3.4. METODOLOGIA

3.4.1. Preparo de soluções padrão

As soluções estoque dos antimicrobianos aminoglicosídeos e da glicose (padrão interno) foram preparadas à concentração de 1000 µg mL^{-1}, separadamente em água. As soluções estoque foram transferidas para frasco âmbar e armazenadas sob refrigeração (2-8 ºC) por um período estabelecido de no máximo de 3 meses.

As soluções de trabalho para a otimização do método e para os estudos de validação foram preparadas diariamente pela diluição da solução estoque dos AG em água.

3.4.2. Preparo das amostras

As amostras de medicamento veterinário foram preparadas pesando uma quantidade de amostra equivalente a 10 mg de STRE e/ou DHS em base nas informações do fabricante. Para isso foram pesadas com uma precisão de ±0,01 mg: 37 mg da amostra 1-STRE e 2-STRE, 18 mg da amostra 3-DHS e 52 mg da amostra 4-STRE/DHS e 5-STRE/DHS. As amostras foram dissolvidas em 10 mL de água com auxílio de banho ultra-sônico, por 5 minutos. Essas soluções foram diluídas a uma concentração final de 10 µg mL^{-1} em água, para serem analisadas por adição de padrão e diluídas a uma concentração final de 20 µg mL^{-1} em água, para serem analisadas por padronização externa. Anterior à análise cromatográfica todas as soluções foram filtradas em filtro de seringa de 0,45 µm.

As amostras de medicamentos veterinários em suspensão injetável (6-DHS e 7-DHS) foram preparadas pela transferência de uma alíquota de 1,0 mL da amostra (equivalente a 10 mg de STRE em base nas informações do fabricante) para um balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com água. A dissolução foi

assistida por ultra-sôm, por 5 minutos. Essas soluções foram diluídas a uma concentração final de 20 µg mL^{-1} em água para serem analisadas por padronização externa e de 10 µg mL^{-1} para serem analisadas por adição de padrão. Anterior à análise cromatográfica, todas as soluções foram filtradas em filtro de seringa de 0,45 µm.

As amostras de unguento para injeção intramamaria (8-STRE a 16-STRE) foram preparadas pesando-se 1,0 g de unguento. À amostra foi adicionada 1,0 mL de acetato de etila e a mistura foi submetida à vortex durante 1 min. Posteriormente, a mistura foi extraída com três porções sucessivas de 2,5 mL de água. A separação da fase orgânica e aquosa foi realizada, após a mistura foi agitada em vortex durante 1 min e centrifugado a 1510 g durante 15 min. A fase aquosa foi coletada e levada a um volume final de 10 mL. As amostras foram diluídas para as análises por padronização externa e adição de padrão a concentrações de 20 e 10 µg mL^{-1}, respectivamente. Anterior à análise cromatográfica todas as soluções foram filtradas em filtro de seringa de 0,45 µm.

3.4.3. Avaliação das condições para a detecção eletroquímica dos aminoglicosídeos

Em uma etapa prévia foram usadas diferentes técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica e amperometría pulsada) para estudar o comportamento eletroquímico dos AG no eletrodo de ouro.

3.4.3.1. Pré-tratamento da superfície do eletrodo de trabalho de ouro

Os eletrodos de ouro foram submetidos a um pré-tratamento mecânico (M, polimento em uma superfície com alumina), um pré-tratamento químico (Q, mistura de peróxido de hidrogênio concentrado e ácido sulfúrico 1:5 v/v durante 10 min) e por fim um

tratamento eletroquímico (E, varreduras sucessivas de potenciais entre 0,0 a 1,5 V vs Ag/AgCl, KCl (sat), em solução 0,5 mol L^{-1} de H_2SO_4 aquoso, a 100 mV s^{-1} até obtenção de um perfil voltamétrico estável).

3.4.3.2. Voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos dos AG foram obtidos num intervalo de potencial de -1,0 a 0,8 V, no eletrólito suporte de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L^{-1}, pH 12,7 e velocidade de varredura 100 mV s^{-1}.

As análises foram feitas no intervalo de concentrações de 2 a 30 µmol L^{-1} para cada antimicrobiano AG.

3.4.3.3. Avaliação dos parâmetros para a detecção por amperometria pulsada associada à cromatografia líquida de alta eficiência

Todas as análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a uma célula de detecção eletroquímica. A fase móvel foi uma solução de NaOH 0,10 mol L^{-1}. A vazão foi de 0,8 mL min^{-1}. Para os estudos preliminares foi usada uma solução de trabalho na concentração de 5,0 µg mL^{-1} em água para os analitos STRE e DHS, preparada a partir da solução estoque (1000 µg mL^{-1}) por diluição de 125 µL da solução em 25 mL de água.

3.4.3.3.1. Estudos preliminares mediante uma matriz completa de experimentos para avaliar o sistema de detecção amperométrica pulsada.

Dado que os AG passivam rapidamente o eletrodo, as análises foram feitas por aplicação de ciclos de três potenciais na detecção amperométrica. Inicialmente se identificaram os fatores controláveis que possuem efeito sobre a variável de resposta (área cromatográfica), de modo que foi avaliado o efeito que tem:

- Potencial de determinação (E_1), no qual a corrente de oxidação eletrocatalítica do analito vai ser medida. Foram avaliados os valores: -0,2, -0,05, 0,0, 0,1 e 0,2 V.

- Potencial de limpeza oxidativa (E_2) que permite uma eficiente remoção do analito e seus produtos de reação da superfície do eletrodo. Foram estudados os potenciais de 0,6, 0,8, 0,9 e 1,0 V.

- Potencial de ativação do eletrodo (E_3), o qual deve permitir a pré-adsorção do analito na superfície do ouro, além de reduzir o óxido de ouro, de modo que existam sítios ativos no eletrodo para a detecção posterior em E_1. Esse potencial foi estudado nos valores -0,15, -0,2, -0,4, -0,5, -0,6 e -0,8 V.

A matriz completa da combinação de todos os fatores foi realizada neste estudo preliminar, mantendo constantes os tempos nos quais são aplicados os potenciais t_1= 400 ms, t_2=200 ms, t_3=400 ms e t_{det}=200 ms. Estes estudos preliminares só foram realizados para a detecção de STRE.

3.4.3.3.2. Planejamento experimental 2^3 + pontos axiais, para a otimização dos potenciais da detecção amperométrica da estreptomicina e diidroestreptomicina

Com a finalidade de encontrar o conjunto de potenciais de detecção que permitem a determinação simultânea de STRE e DHS foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 2^3 incluindo 6 pontos axiais para ampliar o modelo tornando-o quadrático e 3 repetições no ponto central. O planejamento permitiu determinar à significância das variáveis avaliadas, tomando como resposta à área cromatográfica para cada um dos compostos. Para isso, foram escolhidos os extremos do domínio experimental para cada variável como indicado na **Tabela 2.**

Tabela 2. Variáveis e níveis do planejamento experimental fatorial.

Variáveis	Níveis		
	Alto	**Central**	**Baixo**
(A) Potencial E_1, V	-0,1	0,0	0,1
(B) Potencial E_2, V	1,0	0,9	0,8
(C) Potencial E_3, V	-0,4	-0,5	-0,6

E_1= Potencial de determinação, E_2= Potencial de limpeza oxidativa e E_3= Potencial de ativação do eletrodo.

Neste planejamento fatorial, além de realizar as combinações dos níveis dos fatores a investigar que resultam em 8 experimentos, são adicionados pontos, chamados pontos de estrelas. Estes estão situados a uma distância α=1,68 (aproximadamente) abaixo do nível baixo de um fator e a mesma distância acima do nível alto do mesmo fator, permitindo assim a estimativa da curvatura em relação a cada fator. Além disso, são incluídos 3 pontos centrais, resultando em um total de 17 experimentos os quais estão resumidos na **Tabela 3**. Todos estes experimentos foram feitos no mesmo dia e, para tanto, foi injetada 20 µL uma solução contendo STRE e DHS na

concentração de 5,0 µg mL^{-1}, usando uma fase móvel de 0,10 mol L^{-1} de NaOH [1] a uma vazão de 0,8 mL min^{-1} (condições descritas no **item 3.4.3.3**).

Tabela 3. Planilha do planejamento experimental fatorial completo.

Exp.	**(A)** Potencial E_1, V	**(B)** Potencial E_2, V	**(C)** Potencial E_3, V
1	-0,10	0,80	-0,60
2	-0,10	0,80	-0,40
3	-0,10	1,00	-0,60
4	-0,10	1,00	-0,40
5	0,10	0,80	-0,60
6	0,10	0,80	-0,40
7	0,10	1,00	-0,60
8	0,10	1,00	-0,40
9	-0,17	0,90	-0,50
10	0,17	0,90	-0,50
11	0,00	0,73	-0,50
12	0,00	1,07	-0,50
13	0,00	0,90	-0,67
14	0,00	0,90	-0,33
15	0,00	0,90	-0,50
16	0,00	0,90	-0,50
17	0,00	0,90	-0,50

E_1= Potencial de determinação, E_2= Potencial de limpeza oxidativa e E_3= Potencial de ativação do eletrodo.

3.4.3.3.3. Estudo do efeito do tempo de aplicação dos potencias na detecção amperométrica da estreptomicina e diidroestreptomicina

Foi avaliado o tempo no qual é aplicado cada um dos potenciais na detecção amperométrica. Estes estudos foram realizados para a detecção de STRE e DHS. Os seguintes experimentos foram realizados, mantendo constantes os potenciais aplicados (E_1= -0,15 V, E_2=0,85 V e E_3=-0,65 V):

- Avaliação do tempo de determinação t_1 faixa de 200 a 450 ms (t_{det}= 100 ms, t_2= 200 ms e t_3= 400 ms).
- Avaliação do tempo de integração t_{det} faixa de 50 a 450 ms (t_1= 400 ms, t_2=200 ms e t_3= 400 ms).
- Avaliação do tempo de limpeza oxidativa t_2 faixa de 50 a 500 ms (t_1= 400 ms, t_{det}=200 ms e t_3= 400 ms).
- Avaliação do tempo de ativação do eletrodo t_3 faixa de 100 a 500 ms (t_1= 400 ms, t_{det}=200 ms e t_2= 200 ms).

As condições cromatográficas nestes estudos foram as descritas no **item 3.4.3.3.**

3.4.3.3.4. Avaliação da repetitividade inter-dia do método de detecção

A repetitividade inter-dia do método de detecção foi avaliada mediante injeção de uma mistura de STRE e DHS em concentrações de 5,0 µg mL^{-1}, 32 vezes durante três dias, sem realizar limpeza física do eletrodo entre as medições e preparando a fase móvel diariamente. As condições do detector amperométrico foram: E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e E_3= -0,65 V aplicado durante 200 ms. As condições de separação cromatográfica foram: fase móvel NaOH 0,10 mol L^{-1}, a uma vazão de 0,8 mL min^{-1}.

3.4.4. Desenvolvimento do método cromatográfico e parâmetros de conformidade do sistema

3.4.4.1. Avaliação de efeito da força cromatográfica

A força cromatográfica para separação dos aminoglicosídeos STRE e DHS na coluna de troca aniônica foi otimizada, usando soluções dos AG na concentração de 10,0 µg mL^{-1}. Para a separação foram estudadas várias concentrações de solução de NaOH em água como fase móvel, em modo de eluição isocrática, a saber: 0,10, 0,090, 0,080, 0,085, 0,075, 0,070 e 0,060 mol L^{-1}. As vazões avaliadas foram de 0,5 a 1,0 mL min^{-1}. As condições do detector eletroquímico foram E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,65 V aplicado durante 200 ms.

A otimização do método para a quantificação dos AG visou os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico (*system suitability*) estabelecidos pela Farmacopeia Americana (USP, 2010).

3.4.4.2. Condições cromatográficas e do detector amperometrico pulsado.

A validação do método para as análises de medicamentos veterinários foi feita mantendo as condições do detector constantes nos valores: E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,65 V aplicado durante 200 ms. As condições cromatográficas foram: uma coluna cromatográfica CarboPac PA1e fase móvel de NaOH 0,070 mol L^{-1}, a uma vazão de 0,8 mL min^{-1}.

3.4.4.3. Produtos de degradação térmica de Estreptomicina e Diidroestreptomicina

A Farmacopeia Americana (USP, 2010) estabelece que o tempo mínimo de retenção ajustado para a impureza majoritária (proveniente da degradação térmica da STRE) deve ser de 0,5 e a resolução entre a STRE e a impureza deve ser maior que 3.

Para a avaliação deste parâmetro, foram preparadas soluções de STRE e DHS nas concentrações de 30 $\mu g\ mL^{-1}$ e 20 $\mu g\ mL^{-1}$, respectivamente, por diluição da solução estoque de 1000 $\mu g\ mL^{-1}$ com água. As soluções foram colocadas em banho-maria à temperatura controlada de 75 ºC pelos períodos estabelecidos de 1 hora e 24 horas. Após o tempo estabelecido, alíquotas foram analisadas seguindo as condições descritas no **item 3.4.4.2**. O teste foi realizado apenas em duplicata, uma vez que é um teste meramente qualitativo.

3.4.5. Validação do método cromatográfico para a quantificação dos aminoglicosídeos em fármacos de uso veterinário

No presente trabalho, a validação do método proposto foi baseada no "Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica de Medicamentos Veterinários e Fármacos em Produtos para Alimentação Animal" do MAPA publicado na portaria N° 577 MAPA no 2011 (MAPA, 2012). Este guia de validação, além de sua função orientativa, estabelece os requisitos analíticos mínimos que devem ser observados na validação e na rotina analítica dos laboratórios que integram ou desejam integrar a Rede Brasileira de Laboratórios Agropecuários, na área de medicamentos veterinários e produtos afins, a fim de garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

estabilidade, seletividade, faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão (inter- e intra- ensaio), exatidão e robustez.

3.4.5.1. Estudo da estabilidade dos aminoglicosídeos: estreptomicina e diidroestreptomicina

As soluções estoque dos padrões de STRE e DHS na concentração de 100 μg mL^{-1} foram preparadas em água e armazenadas conforme descrição na **Tabela 4.** Dado o período de análise, as soluções estoque de cada AG foram previamente diluídas em água até concentrações de 20 μg mL^{-1} e analisadas seguindo as condições descritas no **item 3.3.4.2**.

Tabela 4. Condições de estocagem para o estudo de estabilidade dos AG em solução.

Condição	Tipo de frasco	Sigla	Tempo (semanas)						
T Ambiente	Frasco Âmbar	AA	0	1	2	3	4	8	12
T ambiente	Frasco Transparente	AT	0	1	2	3	4	8	12
4 ºC	Frasco Âmbar	GA	0	1	2	3	4	8	12
4 ºC	Frasco Transparente	GT	0	1	2	3	4	8	12

3.4.5.2. Estudo da seletividade do método

A seletividade do método foi avaliada mediante estudos de degradação dos fármacos submetendo-os a condições de estresse (meio ácido, meio básico, meio oxidante e temperatura).

Soluções intermediárias de cada fármaco STRE e DHS (100 μg mL^{-1}) foram preparadas nos seguintes meios: 0,1 mol L^{-1} ácido clorídrico, 0,1 mol L^{-1} hidróxido de

sódio, 3% v/v H_2O_2 e soluções em água submetidas a banho-maria na temperatura de 60 ºC (Shabir, 2003).

As soluções dos AG submetidas às condições de estresse foram analisadas após 1 hora e 24 horas do início do teste. Para realizar a análise, as soluções intermediárias da STRE e DHS foram diluídas com água a 20 μg mL^{-1} e foram determinadas seguindo as condições descritas no **item 3.4.4.2.** Ao mesmo tempo foram analisadas soluções padrão recém preparadas.

A degradação foi avaliada por comparação dos cromatogramas dos AG nestas condições de estresse com soluções padrão recém preparadas. Os ensaios de degradação foram realizados em triplicata visto que o guia não estabelece o número de replicatas necessárias para avaliar este parâmetro.

Foi também avaliada a seletividade do método com respeito a alguns princípios ativos comumente coexistentes nas formulações, tais como penicilina G procaínica, penicilina G benzatínica, penicilina G potásica, prednisolona e piroxicam, por comparação dos cromatogramas obtidos destes compostos a concentração de 15 μg mL^{-1}, com os obtidos para STRE e DHS na concentração de 20 μg mL^{-1}.

3.4.5.3. Avaliação da linearidade do método

Para definir a faixa linear do método foi construída previamente uma curva analítica (dinâmica) em uma ampla faixa de concentração. Para tanto foram preparadas soluções contendo STRE e DHS em concentrações correspondentes a 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 μg mL^{-1}. A cada uma destas soluções foi adicionado glicose como padrão interno na concentração de 0,5 μg mL^{-1}. As soluções foram injetadas nas condições cromatográficas previamente descritas no **item 3.4.4.2**. A

partir da curva dinâmica, foi selecionado o intervalo de concentração para a aplicação do método.

Para avaliar a linearidade do método foi construída uma curva analítica de trabalho usando cinco níveis (*I= 5*) de concentração dos AG individualmente, e em sextuplicata de preparo (*J= 6*), seguindo o intervalo de 50 a 150% em relação ao ponto médio da curva selecionado na concentração de 20 $\mu g\ mL^{-1}$. Assim foram preparadas para cada curva cinco soluções de 10 mL contendo STRE e DHS em concentrações correspondentes a 10, 15, 20, 25, 30 $\mu g\ mL^{-1}$. Cada uma de estas soluções foi adicionada de padrão interno de glicose na concentração de 0,5 $\mu g\ mL^{-1}$.

A equação da reta da curva analítica foi obtida pelo método dos mínimos quadrados ordinários. Também foram avaliados os resíduos e o coeficiente de regressão linear (r, linearidade), assim com a possível presença de valores extremos pelo teste de Jacknife. A sensibilidade do método foi obtida pelo coeficiente angular da curva analítica.

3.4.5.4. Determinação do efeito matriz de amostras

Para a determinação do efeito matriz, foram escolhidas três formulações farmacêuticas diferentes: medicamento em pó para injetável (1-STRE e 3-DHS, 4-STRE/DHS), suspensão (6-DHS) e unguento para injetável intramamário (8-STRE).

Os AG foram quantificados mediante adição de padrão e empregando a curva no solvente. Os resultados foram comparados mediante teste estatístico, considerando um nível de confiança de 95%.

Para o método de adição de padrão as amostras de medicamento foram previamente preparadas e diluídas a uma concentração aproximada de 10 μg mL^{-1} conforme descrito no **item 2.5.2.** A curva de adição de padrão foi realizada em 5 níveis (*I= 5*) de concentração e em quadruplicatas (*J= 4*) independentes. A amostra 4-STRE-DHS foi analisada em sextuplicata (J=6). O Guia de validação do MAPA recomenda que cada amostra seja analisada em sextuplicata e no mesmo dia, mas dadas as condições laboratoriais só foram feitas as 6 réplicas para uma das amostras (4-STRE-DHS).

Para o preparo da curva de adição padrão foram transferidos 100 μL da solução de medicamento para cinco balões volumétricos de 10 mL. Para cada nível de concentração, foi adicionado quantidade conhecida do padrão de STRE e DHS, resultando em 5 soluções com concentrações do padrão de 0; 5; 10; 15 e 20 μg mL^{-1} respectivamente. Cada uma destas soluções também foi adicionada do padrão interno de glicose na concentração de 0,5 μg mL^{-1}.

A curva no solvente foi feita conforme descrito no **item 3.4.5.3.** A amostra do medicamento a analisar foi preparada de acordo as condições descritas no **item 2.5.2** e diluída previamente a uma concentração de 20 μg mL^{-1}.

As condições cromatográficas empregadas foram aquelas previamente descritas no item **3.4.4.2.**

3.4.5.5. Avaliação da precisão do método

Para a determinação da precisão intra-ensaio, as amostras de medicamento 1-STRE, 3-DHS, 4-STRE/DHS, 6-DHS e 8-STRE foram analisadas mediante adição de padrão. A curva de adição de padrão foi realizada pela adição de padrão de STRE e DHS em 5 níveis de concentração (*I= 5*) e em quadruplicatas independentes de

análise (*J= 4*). A amostra 4-STRE-DHS foi analisada em sextuplicata, tal como descrito no **item 3.4.5.4**.

A precisão inter-ensaio foi avaliada de igual forma, sendo que a análise das amostras foi repetida em mais dois dias diferentes, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista.

3.4.5.6. Avaliação da exatidão do método

A exatidão do método foi avaliada mediante ensaios de recuperação. Para tanto foram preparadas soluções separadas contendo concentrações das amostras de medicamentos 1-STRE, 3-DHS, 6-DHS, 4-STRE/DHS e 8-STRE em quantidades equivalentes a 10 µg mL^{-1} (calculado em base ao valor nominal, conforme **item 2.5.2**) e fortificadas com concentrações conhecidas do padrão: 5 µg mL^{-1} (nível baixo), 10 µg mL^{-1} (nível meio), 15 µg mL^{-1} (nível alto). Todas as análises foram realizadas em quadruplicatas, exceto a amostra 4-STRE/DHS que foi analisada em sextuplicata. As condições cromatográficas para as análises são aquelas descritas no **item 2.5.4.2.**

3.4.5.7. Avaliação da robustez do método

O teste de robustez para a STRE e DHS foi realizado de acordo com a abordagem de Youden (AOAC, 2002), o qual é um planejamento fatorial fracionário. Foram avaliados sete fatores variáveis, mediante a execução de 8 experimentos.

Nesta abordagem, cada um dos fatores foram avaliados em dois níveis, porém, a escolha do intervalo entre níveis extremos não tem sido fixada na literatura nem no guia de validação. Assim, a escolha do intervalo neste trabalho foi determinada pelos autores (**Tabela 5**).

Tabela 5. Fatores avaliados no ensaio de robustez para STRE e DHS.

Fatores avaliados		Variável (+)[a]	Variável (-)[b]
Concentração de NaOH na fase móvel	(A)	0,070 mol L^{-1}	0,067 mol L^{-1}
Tempo de integração do sinal no pulso amperométrico	(B)	0,2 s	0,18 s
Potencial de determinação do sinal no pulso amperométrico	(C)	-0,15 V	-0,12 V
Lote da coluna de separação cromatográfica	(D)	Lote A	Lote B
Tempo do ultra-som no preparo da amostra	(E)	10 min	0 min
Solvente para solubilização da amostra	(F)	Água	FM[c]
Potencial de ativação do sinal no pulso amperométrico	(G)	- 0,65 V	-0,62 V

[a] Experimentos (+) correspondem aos valores nominais; [b] Experimentos (-) correspondem aos valores que foram variados; [c] Fase móvel de NaOH 0,07 mol L^{-1}

Na **Tabela 6** se apresentam os 8 experimentos realizados que permitem avaliar a robustez do método frente aos fatores escolhidos no ensaio. Para cada um dos ensaios foi usada uma solução de trabalho na concentração de 20 μg mL^{-1} em água dos analitos STRE e DHS e foram seguidas as condições cromatográficas e de detecção previamente otimizadas e descritas no **item 3.4.4.2**.

Tabela 6. Matriz de experimentos na determinação da robustez do método desenvolvido para STRE e DHS.

Fatores	Experimentos							
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
A	+	+	+	+	-	-	-	-
B	+	+	-	-	+	+	-	-
C	+	-	+	-	+	-	+	-
D	+	+	-	-	-	-	+	+
E	+	-	+	-	-	+	-	+
F	+	-	-	+	+	-	-	+
G	+	-	-	+	-	+	+	-

Experimentos (+) correspondem aos valores nominais e (-) aos valores que foram variados.

3.4.5.8. Quantificação dos aminoglicosídeos STRE e DHS em amostras comerciais

As amostras de medicamentos veterinários adquiridas no comércio nacional 2-STRE, 5-STRE/DHS, 7-DHS e 9-STRE a 13-STRE foram quantificadas mediante adição de padrão.

Para o método de adição de padrão as amostras de medicamento foram previamente diluídas a uma concentração aproximada de 10 μg mL^{-1} conforme descrito no **item 2.5.2.**

A curva de adição de padrão foi realizada em 5 níveis de concentração (*I= 5*) e em triplicatas independentes (J= 3). Para o preparo da curva, foram transferidos 100 μL da solução de medicamento para 5 balões volumétricos de 10 mL, para cada um dos níveis de concentração (I). Para cada balão volumétrico foram adicionadas quantidades conhecidas do padrão de STRE e DHS, resultando em concentrações do padrão de 0; 5; 10; 15 e 20 μg mL^{-1}. Cada uma destas soluções foi adicionada de padrão interno de glicose na concentração de 0,5 μg mL^{-1}.

As análises de medicamentos veterinários foram feitas mantendo as condições do detector nos valores: E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,65 V aplicado durante 200 ms. As condições cromatográficas foram: fase estacionaria polimérica CarboPac PA1 e fase móvel de NaOH 0,070 mol L^{-1}, a uma vazão de 0,8 mL min^{-1}.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DOS AMINOGLICOSÍDEOS

Para possibilitar o desenvolvimento de um método analítico para a determinação de AG em formulações farmacêuticas por HPLC com detecção eletroquímica, fez-se necessário, em uma primeira etapa, avaliar o comportamento eletroquímico dos AG no eletrodo de ouro.

4.1.1. Estudo do comportamento voltamétrico dos aminoglicosídeos sobre o eletrodo de ouro, usando voltametria cíclica

O estudo voltamétrico dos AG foi realizado somente após obtenção de uma superfície eletródica homogênea e ativa do eletrodo de ouro. Tal atividade foi verificada, baseado no perfil de oxidação-redução do eletrodo de ouro no meio ácido. O pré-tratamento para a ativação da superfície foi inicialmente realizado mediante a combinação de limpeza mecânica e química. No entanto, com este tratamento de superfície não foi conseguida detecção eletroquímica dos AG; só depois de adicionar um processo eletroquímico aos outros dois (mecânico e químico, o qual está descrito no item 3.4.3.1), foi obtida uma resposta repetitiva e estável em meio ácido, que garantiu a atividade catalítica do eletrodo.

Uma vez obtido o perfil homogêneo e estável de oxidação do eletrodo no meio ácido, foram analisados os perfis dos AG STRE e DHS em um eletrodo de disco de ouro em soluções de 0,1 mol L^{-1} de NaOH. Os voltamogramas cíclicos para a STRE apresentaram dois sinais anódicos em torno de 0,1 V e 0,45 V vs Ag/AgCl, KCl (sat) com características de processo irreversível, **Figura 14**.

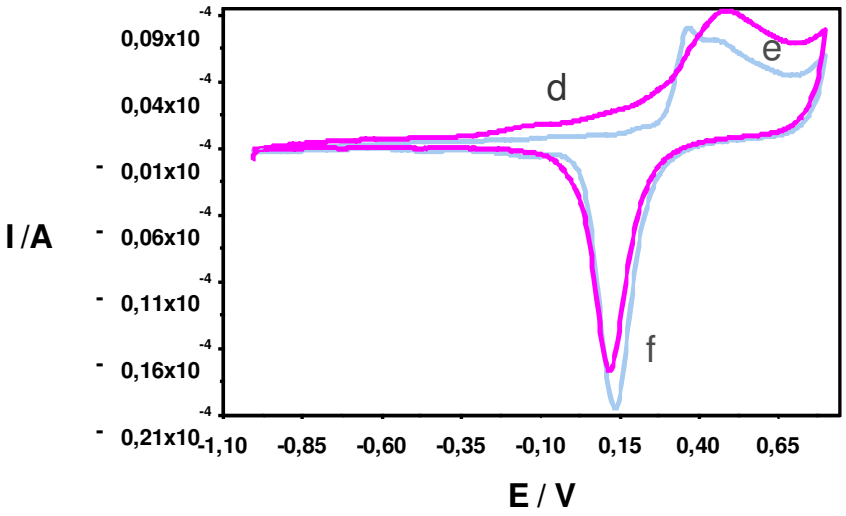

Figura 14. Voltamogramas cíclicos obtidos para a STRE (30 µmol L^{-1}) sobre o eletrodo de ouro, eletrólito suporte solução de 0,1 mol L^{-1} de NaOH desaerada; v = 100 mV s^{-1}. (--) Perfil do eletrodo de ouro e (--) perfil após adição de STRE. O sinal **d** corresponde a corrente de oxidação dos grupos hidroxila, **e** dos grupos amino e **f** o sinal de redução do óxido de ouro.

No voltamograma pode se observar um sinal anódico para a oxidação dos grupos hidroxila dos glicosídeos (onda d) o qual começa em aprox. de -0,2 V e atinge um máximo em torno de 0,3 V, potencial no qual a resposta oxidativa é atenuada e coincide com o início da formação de óxido na superfície do eletrodo de ouro. Nota-se também que o início da oxidação dos grupos amina da STRE (grupos guanidinos e metil amino) ocorre em potenciais mais positivos que os grupos hidroxilas gerando um pico anódico em torno de 0,45 V (concomitante com a formação do óxido de ouro, onda e). Além disso, se observa diminuição deste sinal quando a formação de óxido cessa, o qual suporta o mecanismo descrito na literatura que o óxido de ouro é o encarregado de catalisar a reação. Na varredura inversa, a redução de óxido de ouro no eletrodo ocorreu no mesmo valor de potencial, 0,15 V (onda f), tanto na presença como na ausência de STRE. No entanto, na presença do analito a intensidade de pico ligeiramente diminuiu (5-10%). Isto significa que a formação do óxido de ouro é um pouco suprimida na presença de STRE. O mais provável é que tal atenuação é causada por quimiossorção de íons no eletrodo de ouro nos locais de superfície livre de óxido. Também se observa perda de atividade do eletrodo

recoberto de óxido dada a ausência de sinal na região de 0,7 a 0,3 V na varredura reversa.

A partir das observações e pelos mecanismos descritos na literatura pode-se inferir que a STRE apresenta dois tipos de resposta voltamétrica: (i) a oxidação dos grupos aminos, que pode ser classificado como um processo catalisado pelo óxido de ouro e pela transferência de oxigênio para o analito a qual é promovida através dos óxidos hidratados intermediários lábeis do óxido de ouro formado na superfície do eletrodo e (ii) a oxidação das hidroxilas na região tipicamente denotada como janela "óxido livre" em que a reação pode ser monitorada com o mínimo de interferência de fundo.

O comportamento eletroquímico da DHS no eletrodo de ouro também foi avaliado, observando-se um comportamento semelhante ao da STRE. Na **Figura 15** são apresentados os voltamogramas cíclicos para a DHS em NaOH 0,1 mol L^{-1}.

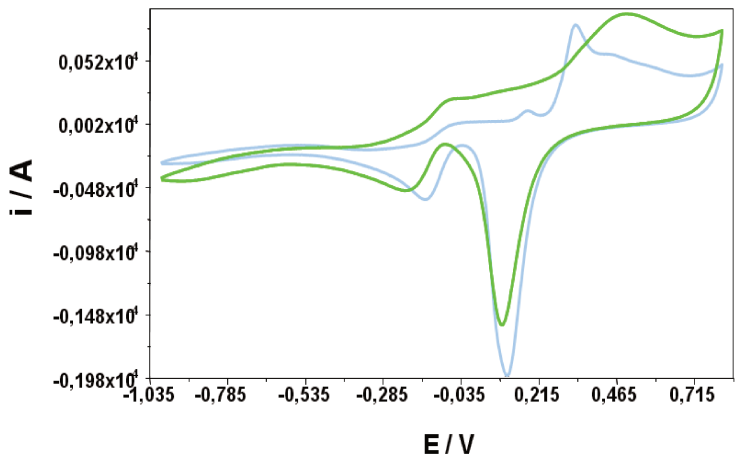

Figura 15. Voltamogramas cíclicos obtidos para a DHS (30 µmol L^{-1}) sobre o eletrodo de ouro, eletrólito suporte solução de 0,1 mol L^{-1} de NaOH aerada; v = 100 mV s^{-1}. (--) Perfil do eletrodo de ouro na presença de O_2 dissolvido e (--) perfil após adição de DHS.

Na **Figura 16** são apresentados voltamogramas cíclicos em diferentes concentrações de STRE. Verifica-se que ocorre um aumento das correntes de picos

anódicas em 0,1 e 0,45 V em função da concentração de STRE em solução, até uma concentração de 30 μmol L^{-1}. Para concentrações maiores a corrente de pico em -0,45 V passa a independer da concentração de STRE (**Figura 17**), o que indica que houve saturação e/ou passivação da superfície do eletrodo. É conhecido que os orbitais d livres do ouro estão disponíveis para interagir com bases de Lewis tais como os grupos aminos. Embora isso possa beneficiar o processo de eletrocatálise, graças ao aumento do tempo de residência dos analitos no campo aplicado na interface eletrodo/solução, também pode ocasionar uma rápida passivação da superfície eletródica. Comportamento semelhante foi observado para a DHS.

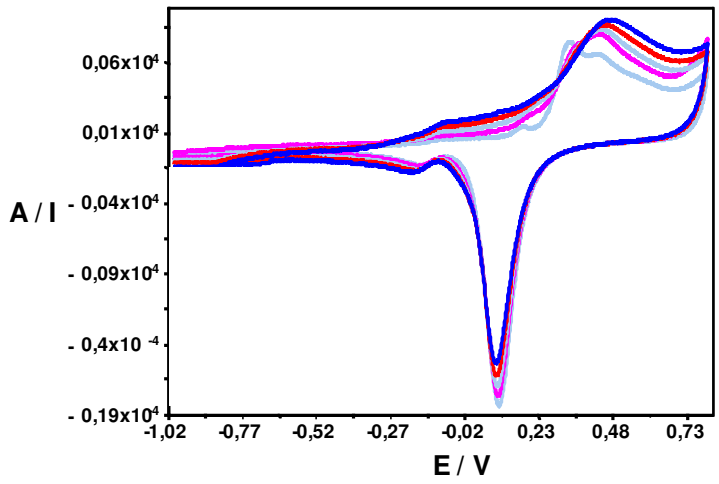

Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos para a STRE sobre o eletrodo de ouro, eletrólito suporte solução de 0,1 mol L^{-1} de NaOH; v = 100 mV s^{-1}.) (**--**) Perfil do eletrodo de ouro, perfil após adição de STRE correspondente a concentrações de 4 (--), 12 (--), 20 (--), 30 (--) μmol L^{-1}.

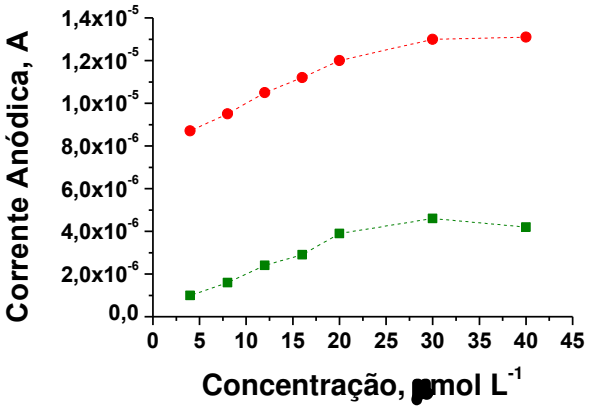

Figura 17. Dependência das correntes anódicas de em função da concentração do padrão de STRE: (-■-) corrente medida a 0,2 V e (-■-) corrente medida a 0,5 V.

Dos estudos se pode inferir que é possível realizar a detecção dos AG (estreptomicina e diidroestreptomicina), na faixa de *ca*. -0,15 a 0,20 V. O baixo valor de oxidação é promissor no sentido de conferir maior seletividade ao método.

Para avaliar se o processo é governado pela difusão da espécie eletroativa para a superfície do eletrodo, foi realizado um estudo no qual foi variada a velocidade de varredura na voltametria cíclica, no intervalo de 5 a 500 mV s^{-1}. Dos resultados apresentados na **Figura 18,** verificou-se que as correntes de pico de oxidação dos grupos álcool (medida em 0,2 V) e a dos grupos amino (medida em 0,45 V) variam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando que os processos de oxidação dos aminoglicosídeos sobre o eletrodo de ouro são controlados pela difusão.

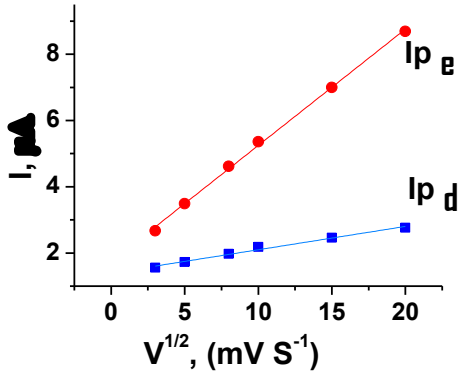

Figura 18. Dependência linear das correntes de pico do padrão de STRE em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. $I_{pe=}$ corrente do sinal de oxidação do grupo amino é $I_{pd=}$ corrente do sinal de oxidação do álcool.

4.1.2. Parâmetros para a detecção amperométrica pulsada associada à cromatografia líquida de alta eficiência

A detecção dos AG por HPLC com detecção eletroquímica, requer o modo amperométrico pulsado, no sentido de manter a superfície ativa do eletrodo e, assim, viabilizar uma resposta cromatográfica repetitiva e uma linha de base estável.

Neste trabalho, foi escolhida a detecção amperométrica por aplicação de três potenciais, na forma de pulso, o que resulta em maior simplicidade de otimização, além de corresponder às condições do equipamento disponível. Alguns trabalhos relatados na literatura empregam 4 ou até 6 potenciais distintos no pulso de detecção, conforme relatado anteriormente na introdução.

A escolha da combinação dos potenciais ótimos para as análises foi feita usando para a separação dos AG uma coluna de troca aniônica CarboPac^{TM} PA1 e uma fase móvel 0,1 mol L^{-1} de NaOH, a qual é indicada por muitos autores para a separação de carboidratos (LaCourse, 2009). A um pH > 12, os grupos hidroxilos dos anéis glicosídeos das moléculas de STRE e DHS se encontram parcialmente dissociados e os grupos aminos dos AG encontram-se na forma catiônica. Sendo assim, em meio

básico são os hidroxilos ionizados os encarregados do equilíbrio de troca aniônica na coluna cromatográfica. A célula amperométrica usada nestes experimentos é uma célula tipo *wall Jet* (Variocell Bioscan, Metrohm) equipada com um eletrodo de referência de tipo sólido. Uma vez que as análises de voltametria cíclica foram feitas com um eletrodo de referência de Ag/AgCl, KCl (sat) se fez necessário realizar a conversão dos valores de potencial mediante a equação (**Equação 1**) fornecida pelo fabricante (Metrohm). Após estas considerações foi definida uma faixa experimental de -0,18 a 0,16 V vs eletrodo *Hy-Ref.*

$$E_{\ Hy-Ref}\ (mV) = E_{Ag,AgCl}\ (mV) -\ 328 + 29{,}9 * \ pH \quad \textbf{Equação 1}$$

Na **Figura 19** é apresentada a variação da resposta (só foram medidas respostas anódicas) em função do potencial de ativação (E_3) aplicado, mantendo constantes as demais condições. Só são mostrados os resultados para potencias de determinação E_1= -0,15 V, E_1= 0,0 V, E_1=0,10 V, os quais se encontram dentro da faixa de resposta observada na voltametria cíclica. Todos os estudos a princípio foram realizados com a STRE, uma vez que e DHS apresenta comportamento semelhante.

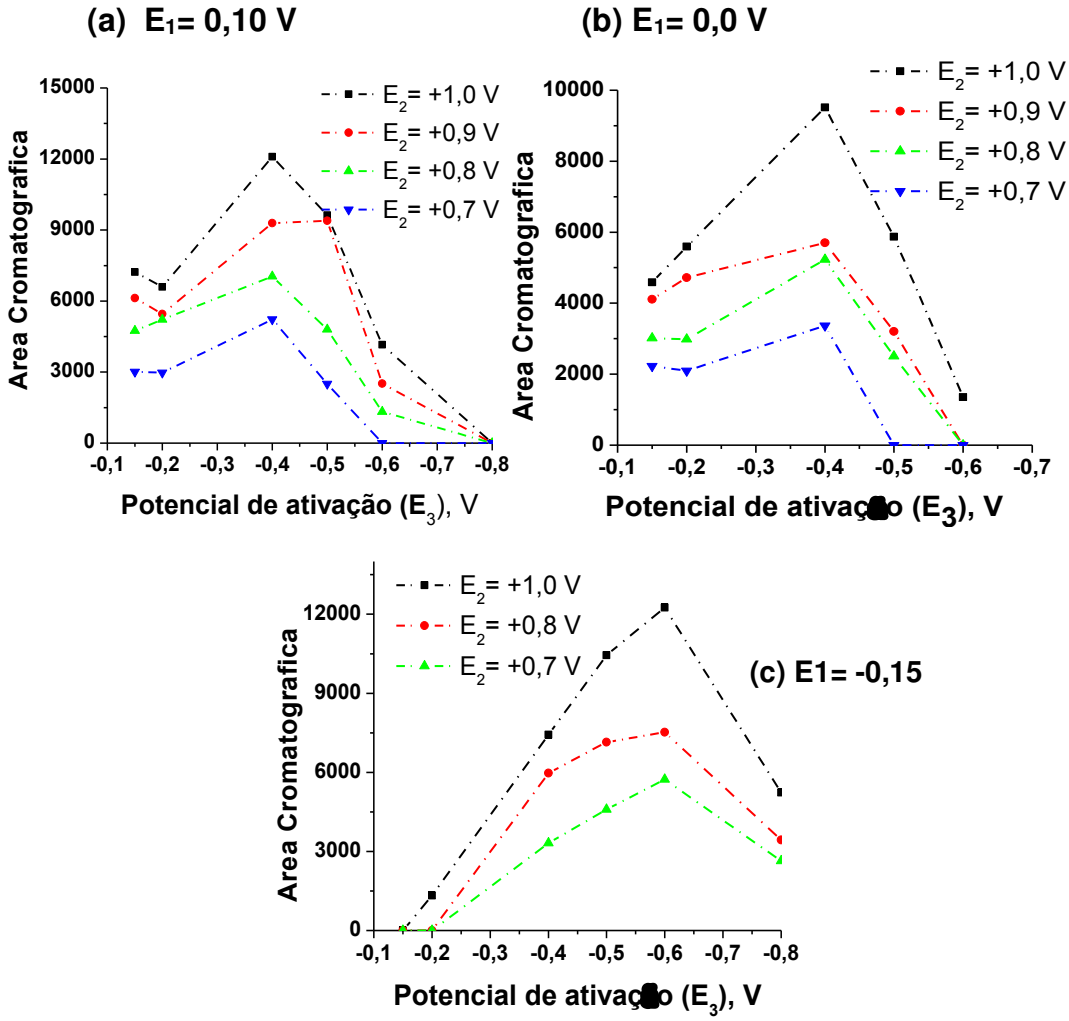

Figura 19. Variação da resposta cromatográfica da STRE em função do potencial de ativação.

Os cromatogramas característicos obtidos em duas condições diferentes, nestes estudos preliminares estão apresentados na **Figura 20**.

Os dados obtidos evidenciam duas tendências em geral:

- A aplicação de potencias (E_2) maiores que 0,7 V, permite uma limpeza oxidativa efetiva das espécies intermediárias adsorvidas na superfície, embora tenha que ser considerado que não é recomendado o uso de potenciais superiores a 1,2 V, uma vez que pode ocorrer oxidação da fase móvel.

- Existe uma relação entre o potencial de determinação (E_1) e o potencial de ativação (E_3). De modo geral a oxidação da STRE é favorecida com a aplicação de potenciais E_3 mais redutivos e somente quando são aplicados potencias de determinação E_1 de -0,15 V ou menores. Efeito oposto é observado ao se aplicar potenciais E_1 maiores que 0,0 V.

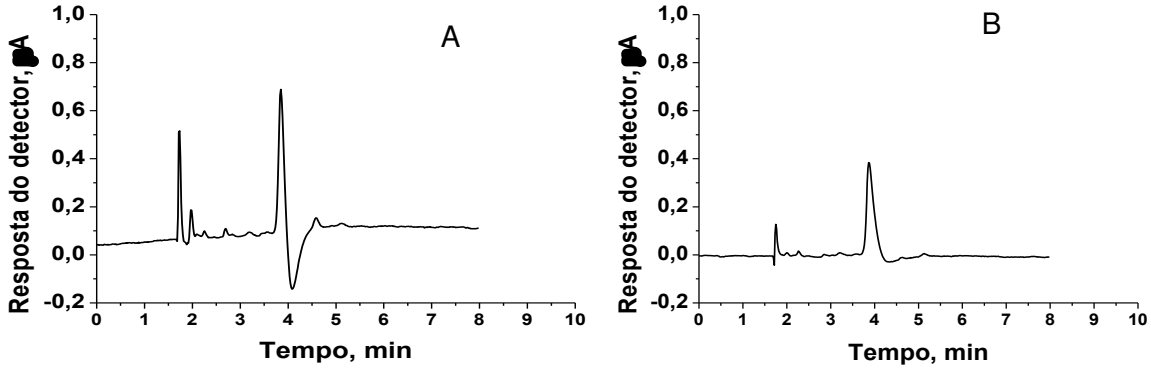

Figura 20. Cromatogramas obtidos para STRE (5 µg mL^{-1}). Condições cromatográficas: coluna CarboPac PA1, eluição isocrática com NaOH 0,10 mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}. Volume de injeção: 20 µL. Detecção amperométrica pulsada: (A) E_1= 0,10 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,8 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,50 V aplicado durante 200 ms. (B) E_1= 0,10 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,8 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,15 V aplicado durante 200 ms.

Estes estudos preliminares também permitiram concluir que ao aplicar potencias E_3= -0,8 V o analito é fortemente adsorvido na superfície do eletrodo, reduzindo a área ativa do mesmo, de modo que o sinal do analito é originado pela supressão do processo de formação de óxido. Sendo assim, se obtém um sinal da STRE por detecção indireta e os picos resultantes são negativos (resultados não apresentados).

4.1.3. Otimização dos parâmetros de amperométrica de STRE e DHS mediante o planejamento experimental 2^3 + pontos axiais

Uma vez conhecidas as faixas de potenciais nas quais é possível à detecção, e sob o entendimento do processo eletroquímico da STRE, realizou um planejamento experimental fatorial, que permitiu obterem os valores do conjunto de potenciais adequados para identificação e quantificação simultânea de STRE e DHS, tomando como variável de resposta à área do pico cromatográfico.

Na **Tabela 7** são apresentadas as respostas obtidas na execução do planejamento experimental.

Tabela 7. Matriz de experimentos do planejamento composto central e respostas de área cromatográfica para os padrões de STRE e DHS.

Exp.	**(A)** Potencial E_1, V	**(B)** Potencial E_2, V	**(C)** Potencial E_3, V	Área, STRE	Área, DHS
1	-0,10	0,80	-0,60	11398	14404
2	-0,10	0,80	-0,40	8151	11297
3	-0,10	1,00	-0,60	11145	16845
4	-0,10	1,00	-0,40	9399	13388
5	0,10	0,80	-0,60	1613	1112
6	0,10	0,80	-0,40	9184	10229
7	0,10	1,00	-0,60	4014	3877
8	0,10	1,00	-0,40	10326	14361
9	-0,17	0,90	-0,50	9878	13388
10	0,17	0,90	-0,50	3986	4488
11	0,00	0,73	-0,50	9931	11447
12	0,00	1,07	-0,50	12443	18547
13	0,00	0,90	-0,67	9559	10324
14	0,00	0,90	-0,33	9246	12620
15	0,00	0,90	-0,50	10124	14890
16	0,00	0,90	-0,50	11140	15300
17	0,00	0,90	-0,50	11484	15445

E_1= Potencial de determinação, E_2= Potencial de limpeza oxidativa e E_3= Potencial de ativação do eletrodo.

Na **Tabela 8** e na **Figura 21** se apresentam os efeitos principais e interações das variáveis independentes, tendo em conta um modelo quadrático e considerando um limite de confiança de 95%. A análise de variância foi feita considerando o erro puro. O modelo quadrático foi capaz de explicar 81% da variância, indicando que esse modelo é adequado para expressar a relação entre os efeitos e a resposta.

Tabela 8. Coeficientes de regressão para a resposta da área cromatográfica do padrão de STRE.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(7)	p-valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
E1 (L)	-1820,71	316,50	-5,75	0,0006	-2569,11	-1072,30
E1 (Q)	-1611,56	348,35	-4,62	0,0024	-2435,29	-787,83
E2 (L)	641,63	316,50	2,02	0,0822	-106,77	1390,04
E2 (Q)	-107,19	348,35	-0,30	0,7672	-930,92	716,54
E3 (L)	612,41	316,50	1,93	0,0942	-135,99	1360,82
E3 (Q)	-738,11	348,35	-2,12	0,0718	-1561,83	85,62
E1E2	318,50	413,52	0,77	0,46633	-659,34	1296,34
E1E3	2359,50	413,52	5,71	0,0007	1381,66	3337,34
E2E3	30,25	413,52	0,07	0,9473	-947,59	1008,09

L: linear, Q: quadrático, Os valores em vermelho correspondem aos parâmetros estatisticamente significativos.

A **Figura 21** mostra o diagrama de Pareto que é uma das formas de se avaliar visualmente a influência dos fatores estudados na resposta. Neste gráfico, a magnitude dos efeitos padronizados é representada pelas colunas, enquanto que a linha transversal às colunas representa a magnitude dos efeitos com significado estatístico para p= 0,05, ou seja, os fatores que são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança. Verifica-se que para a STRE o termo linear e quadrático da variável potencial de determinação (E_1) tem um efeito negativo significativo no processo de detecção. Entretanto, pode-se evidenciar uma interação significativa positiva entre E_1 e E_3 (potencial de ativação). Esta interação fica evidente na **Figura 21 B**, a qual mostra que com a aplicação de potenciais de ativação mais redutivos no

pulso da detecção amperométrica, a resposta é altamente influenciada e dependente do potencial E_1.

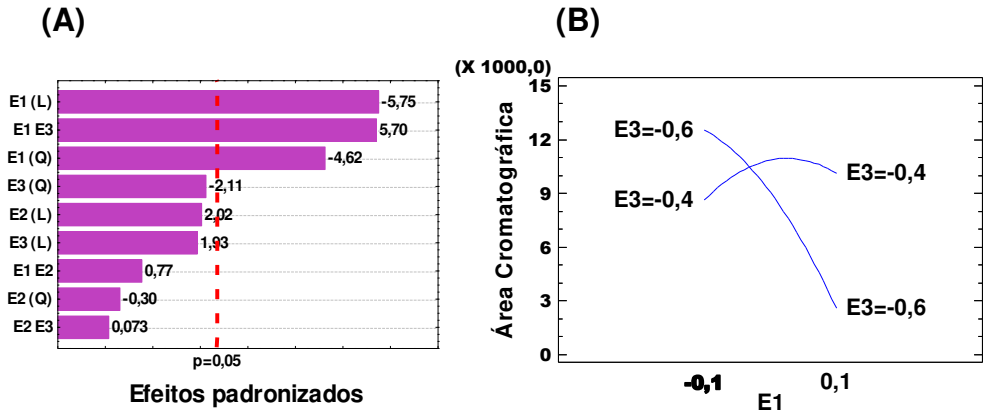

Figura 21. Gráfico de Pareto de efeitos padronizados (A). Gráfico de interações para STRE (B): nesta análise o fator de interesse é variado de seu baixo nível a seu alto nível, enquanto todos os outros fatores são mantidos constantes em seus valores centrais.

De acordo com a análise de efeitos significativos, na **Tabela 9** se resume a análise de ANOVA do modelo proposto, demonstrando que o modelo possui significância estatística, uma vez que o valor de F_{cal} (18) é maior que o tabelado (3,41).

Tabela 9. Resumo da análise da regressão, ANOVA para a área cromatográfica do padrão STRE.

Fatores	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcal	p-valor
Regressão	116036769	3	38678923	18	0,002
Resíduos	27433052	13	2110235		
Total	143469821	16			

R^2=0,80879; Ajuste: 0,76466; $F_{3:13,0.05}$ = 3,41

Também foram construídas as superfícies de resposta a partir dos resultados obtidos. Na **Figura 22** são apresentadas as relações entre o potencial de limpeza oxidativa (E_2) e o potencial de determinação (E_1), quando o potencial E_3 foi de -0,4 e –0,6 V, respectivamente.

(A) E_3= -0,4 V **(B)** E_3= -0,6 V

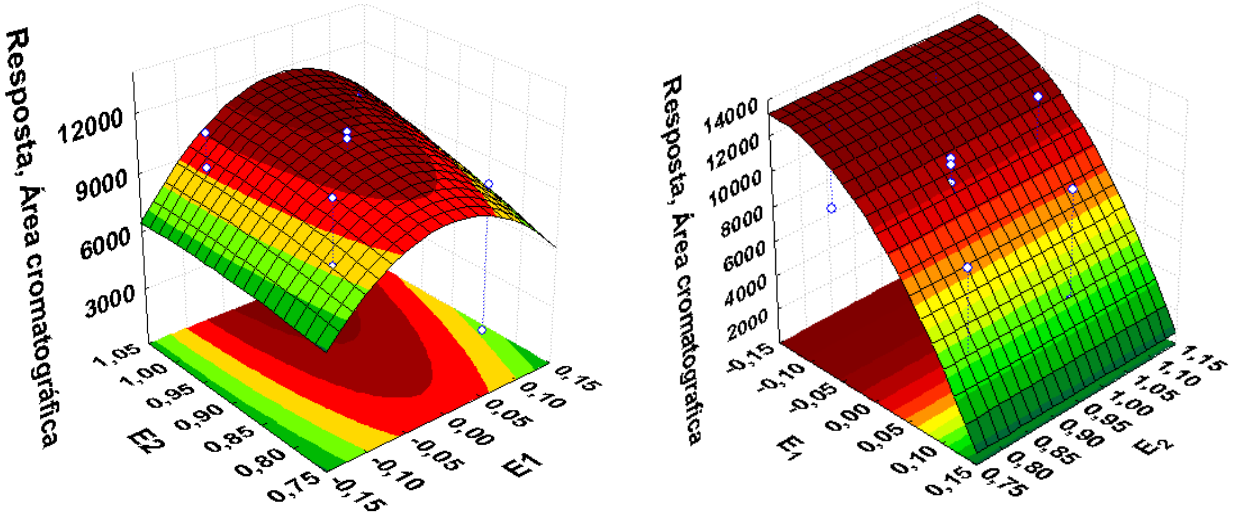

Figura 22. Superfície de resposta do planejamento experimental para STRE ao aplicar potenciais (A) E_3= -0,4 V e (B) E_3= -0,6 V.

Na **Figura 22 A** verifica-se uma baixa resposta do sinal oxidativo para STRE, com aplicação de potenciais E_1 acima de 0,05 V e abaixo de -0,05 V, independente do potencial E_2 aplicado. Entretanto, pela superfície, nota-se, que se atinge um máximo de resposta só como a aplicação de potenciais E_2 superiores a 0,9 V e E_1 na faixa de E_1= 0,05 e -0,05 V (superfície em vermelho). Entretanto, o perfil da superfície de resposta na **Figura 22 B** que foi construída considerando-se um potencial de E_3= -0,6 V apresenta um comportamento completamente diferente à **Figura 22 A**, neste gráfico só foi conseguido um máximo de resposta analítica com a aplicação de potenciais de determinação inferiores a -0,1 V, independentemente do potencial E_2 usado na detecção (dentro da fixa de potenciais de trabalho). Estes observações foram muito importantes, uma vez que no pulso triplo de detecção amperométrica, é recomendável o uso de potenciais de limpeza (E_2) menores que 0,9 V, a fim de evitar uma excessiva formação e acumulação de óxido de ouro, o qual prejudica o desempenho do método.

A resposta eletroquímica dos AG STRE e DHS na faixa de potenciais estudados tem comportamento semelhante (**Anexo 1**). Isso pode ser observado no gráfico de pareto

para DHS (**Figura 23**), no qual se verifica que todos os fatores foram significativos, assim como, a interação significativa positiva entre E_1 e E_3. Além disso, cabe ressaltar no gráfico de efeitos principais, o efeito negativo predominante do potencial de determinação.

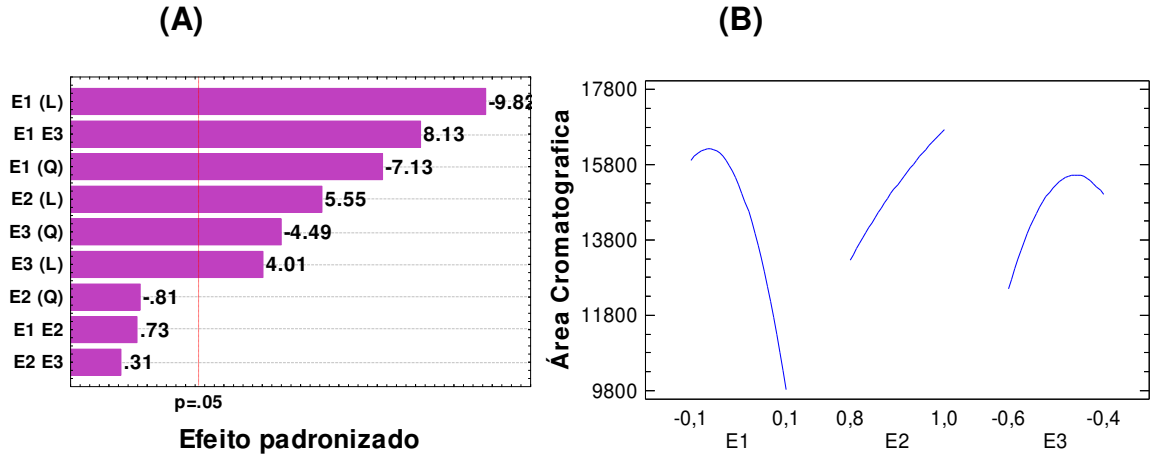

Figura 23. (A) Gráfico de pareto de efeitos padronizados para DHS . (B) Gráfico de efeitos principais DHS: nesta análise o fator de interesse é variado de seu baixo nível a seu alto nível, enquanto todos os outros fatores são mantidos constantes em seus valores centrais.

Em geral, estes experimentos permitiram determinar que a faixa de potenciais aplicados que maximizam a resposta são: potenciais E_1 inferiores a 0,0 V e E_3 menores que -0,6 V **(Figura 22)**. Baseado nestes resultados, um segundo planejamento foi executado uma vez que foi de interesse explorar também faixas de potenciais de determinação menores do que -0,15 V. Para tanto, foi elaborado um planejamento fatorial de 2 níveis de iguais características ao anterior. Os níveis estudados foram definidos e descritos anteriormente (**Tabela 10**). Os 17 experimentos laboratoriais foram executados aleatoriamente, conforme a matriz do planejamento fatorial mostrado na **Tabela 11**.

Tabela 10. Variáveis e níveis do planejamento de otimização.

Variáveis	Níveis		
	Alto	**Central**	**Baixo**
(A) Potencial E_1, V	0,0	-0,1	-0,2
(B) Potencial E_2, V	0,9	0,8	0,7
(C) Potencial E_3, V	-0,5	-0,6	-0,7

E_1= Potencial de determinação, E_2= Potencial de limpeza oxidativa e E_3= Potencial de ativação do eletrodo.

Tabela 11. Matriz de experimentos do planejamento de otimização das respostas cromatográficas para os padrões de STRE e DHS.

Exp.	**(A)** Potencial E_1, V	**(B)** Potencial E_2, V	**(C)** Potencial E_3, V	Área, STRE	Área, DHS
1	-0,20	0,90	-0,70	9161	10749
2	-0,20	0,90	-0,50	7674	8737
3	-0,20	0,70	-0,70	8624	9398
4	-0,20	0,70	-0,50	7092	8100
5	0,00	0,90	-0,70	5133	6487
6	0,00	0,90	-0,50	9236	10106
7	0,00	0,70	-0,70	4055	4238
8	0,00	0,70	-0,50	6151	6149
9	-0,27	0,80	-0,60	7893	9168
10	0,07	0,80	-0,60	4015	4182
11	-0,10	0,97	-0,60	9128	11157
12	-0,10	0,63	-0,60	6728	6793
13	-0,10	0,80	-0,77	7638	7373
14	-0,10	0,80	-0,43	7404	8256
15	-0,10	0,80	-0,60	10360	11810
16	-0,10	0,80	-0,60	10210	11910
17	-0,10	0,80	-0,60	10210	11880

E_1= Potencial de determinação, E_2= Potencial de limpeza oxidativa e E_3= Potencial de ativação do eletrodo.

O modelo matemático encontrado, com os seus respectivos coeficientes estatísticos, estão apresentados na **Tabela 12**. Este modelo foi obtido a partir das regressões não lineares (modelo quadrático) dos dados experimentais da **Tabela 11**. Como nem sempre os coeficientes de regressão mostrados são estatisticamente significativos é

necessário realizar uma análise estatística apropriada para assegurar a validade destes coeficientes dentro de um nível de confiança estabelecido (p <0,05). Os valores em vermelho correspondem aos parâmetros estatisticamente significativos.

Tabela 12. Efeitos estimados do planejamento de otimização para a resposta do padrão de STRE.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(7)	p-valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
E1 (L)	-1061,59	132,08	-8,04	0,000	-1384,78	-738,41
E1 (Q)	-1485,22	160,36	-9,26	0,000	-1877,62	-1092,83
E2 (L)	682,32	132,08	5,17	0,002	359,13	1005,50
E2 (Q)	-787,31	160,36	-4,91	0,003	-1179,71	-394,92
E3 (L)	204,03	132,08	1,54	0,173	-119,15	527,22
E3 (Q)	-931,21	160,36	-5,81	0,001	-1323,60	-538,81
E1E2	380,50	172,57	2,20	0,070	-41,76	802,76
E1E3	1152,25	172,57	6,68	0,001	729,99	1574,51
E2E3	256,50	172,57	1,49	0,188	-165,76	678,76

L: linear; Q: quadrático; Os valores em vermelho correspondem aos parâmetros estatisticamente significativos.

Após a análise estatística dos coeficientes, a influência dos fatores e suas interações sobre as respostas foram analisadas através de análise de variância (ANOVA), mediante teste F e coeficiente de correlação (R^2), verificando desta maneira se o modelo representa um grau de ajuste adequado aos dados experimentais. Estes resultados estão mostrados na **Tabela 13,** onde se observa que o coeficiente de correlação e a percentagem de variância explicada foram satisfatórios, explicando 94% da variância com um coeficiente de correlação de 0,89. Observa-se, também, que o valor de F calculado de 27 é maior que o valor de F tabelado (3,2) a um nível de confiança de 95%. Deste modo, pode-se afirmar que o referido modelo apresentou significância estatística e que pode ser utilizado para fins de previsão.

Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) para a resposta da área cromatográfica da STRE.

Fatores	Suma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcal	p-valor
Regressão	66581918	6	11096986	27	0,002
Resíduos	3682555	10	409173		
Total	57605500	16			

R^2= 0,93607; Ajuste: 0.89345; $F_{6,10,0,05}$ = 3,21.

A otimização da resposta de detecção eletroquímica dos analitos foi determinada utilizando a metodologia de superfície de resposta. Considerando que o modelo quadrático de efeito das variáveis na detecção de STRE e DHS (**Anexo 2**) foi validado, o mesmo foi usado para gerar as superfícies de resposta nesta nova região de exploração, tendo como objetivo maximizar a resposta medida em área cromatográfica para os dois analitos. Na **Figura 24** (A e B) são apresentadas as relações entre as duas principais variáveis determinadas pela análise estatística, o potencial E_1 e E_3, quando o potencial de limpeza oxidativa E_2 foi fixado em 0,8 V. Observa-se que as superfícies para os dois AG atingem um máximo com o mesmo conjunto de potenciais aplicados na detecção.

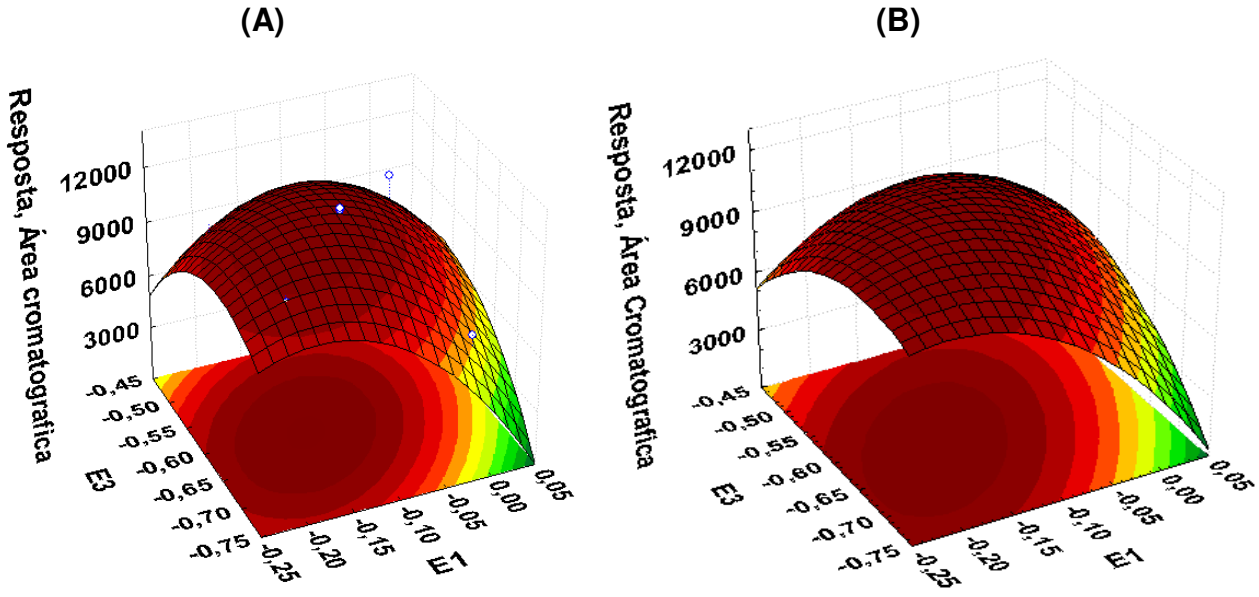

Figura 24. Superfície de resposta do planejamento experimental de otimização para (A) STRE e (B) DHS, onde E_2 foi fixado em 0,8 V.

Finalmente ao unificar os resultados, dos gráficos de interações e os dos efeitos principais, se conseguiu determinar os melhores potenciais para a detecção simultânea dos aminoglicosídeos STRE e DHS, os quais são apresentados na **Tabela 14.**

Tabela 14. Potenciais ótimos para a detecção simultânea dos aminoglicosídeos STRE e DHS**.**

Fator	Parâmetro Ótimo
Potencial de determinação	-0,15 V
Potencial de limpeza oxidativa	+0,85 V
Potencial de ativação do eletrodo	-0,65 V

4.1.4. Estudo do efeito dos tempos de aplicação dos potenciais

Mantendo constantes as condições de separação anteriormente descritas e os valores ótimos de potenciais encontrados mediante o planejamento experimental, foram determinados os tempos mínimos necessários durante os quais devem ser aplicados os potencias no pulso de detecção para conseguir uma maior resposta (medida em área cromatográfica). Os resultados são apresentados na **Figura 25**.

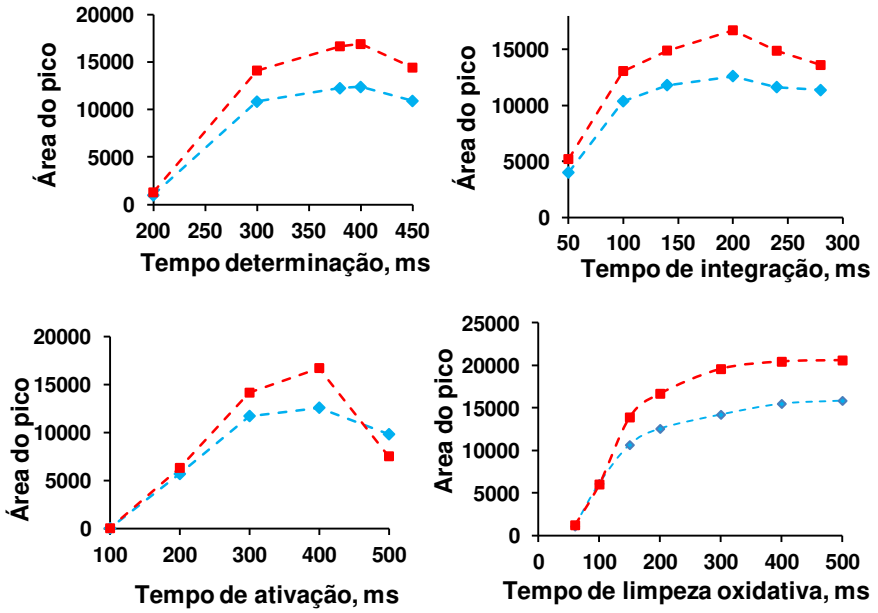

Figura 25. Variação da resposta cromatográfica do (-•-) DHS e (-•-) STRE, em função do potencial aplicado em cada etapa do pulso.

Finalmente, com estes resultados foram determinadas as melhores condições para a detecção simultânea de STRE e DHS, estabelecendo os valores dos potenciais e os tempos de aplicação no pulso de detecção, a saber: o potencial de determinação de -0,15 V durante 400 ms (200 ms de integração do sinal), o potencial de limpeza oxidativa de +0,85 V durante 200 ms e o potencial de ativação do eletrodo de -0.65 V durante 400 ms. O tempo total da aplicação do pulso é de 1 s.

A seguir é apresentado um cromatograma característico nas condições otimizadas.

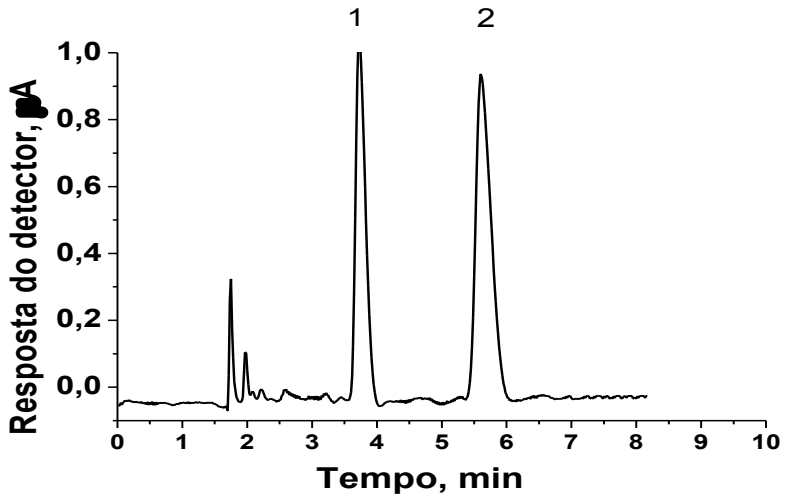

Figura 26. Cromatograma obtido para a separação de STRE (1) e DHS (2). Condições cromatográficas: coluna CarboPac PA1, eluição isocrática com NaOH 0,10 mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}. Volume de injeção: 20 µL. Detecção amperométrica pulsada: E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,65 V aplicado durante 200 ms. Concentração do STRE e DHS: 5 µg mL^{-1}.

4.1.5. Avaliação da repetitividade do método

A repetitividade do método foi avaliada pela análise sucessiva de uma solução padrão de STRE e DHS na concentração de 5,0 µg mL^{-1}, durante 3 dias, sem nenhuma limpeza adicional. A dispersão dos resultados da resposta medida em área cromatográfica, expressos pela estimativa do desvio padrão relativo foi inferior a 3% (n= 32), indicando que os potenciais e tempos selecionados permitem manter a

superfície do eletrodo de ouro limpa e ativa. Além disso, e considerando que em HPLC-PAD o tempo de retenção é o parâmetro que permite a identificação tentativa, com estes experimentos também foi avaliada a repetitividade dos tempos de retenção, mantendo precauções no preparo da fase móvel, a fim de diminuir efeito dos íons carbonato na separação cromatográfica. Os resultados são apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Avaliação da repetibilidade na resposta cromatográfica e no tempo de retenção.

	t_R, min [a]			Área, µA s [a]		
	Média	**s**	**RSD, %**	**Média**	**s**	**RSD, %**
Estreptomicina	3,72	0,01	0,27	12783	332	2,6
Diidroestreptomicina	5,62	0,03	0,45	16852	452	2,7

[a] Média de 32 replicatas, s= estimativa do desvio padrão absoluto; RSD: estimativa do desvio padrão relativo.

4.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO E PARÂMETROS DE CONFORMIDADE DO SISTEMA

4.2.1. Efeito da força cromatográfica

O uso de fases móveis com pH > 12 é geralmente recomendado para separações de carboidratos em colunas de troca aniônica. No caso da STRE, o composto apresenta baixa retenção (t_R= 3,7 min) em uma concentração de NaOH de 0,1 mol L^{-1}. No entanto, com a diminuição da concentração de NaOH e consequentemente do pH é observado que os tempos de retenção da STRE aumentam por causa da diminuição da competição dos hidróxido pelos sítios de troca aniônica da coluna cromatográfica.

Como pode ser observado na **Figura 27**, uma concentração de NaOH de 0,070 mol L^{-1} resulta em um fator de retenção maior que 2 para ambos AG, o qual é o valor recomendado para a validação de métodos por HPLC para determinação de

fármacos (o fator de retenção é calculado pela razão dos tempos que as moléculas residem na fase estacionária e na fase móvel) (Shabir, 2003). Com essa fase móvel o tempo de corrida cromatográfica foi de 16 min, o que seria aceitável no contexto de análises de rotina.

A eficiência da coluna (número de pratos, N) a uma concentração de fase móvel de NaOH de 0,070 mol L^{-1} foi de 2000 e 2700 para STRE e DHS, respectivamente. O valor de eficiência obtido no método desenvolvido é superior ao recomentado pela Farmacopeia Americana (N= 1000) e comparável com os valores reportados no trabalho de Hanko e colaboradores (Hanko e Rohrer, 2007).

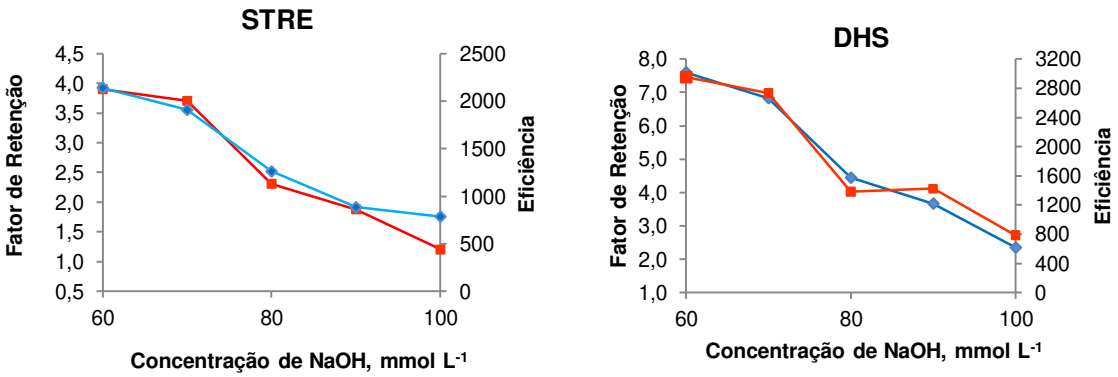

Figura 27. Efeito da força cromatográfica na eficiência (N -♦-) e no fator de retenção (k -■-)

4.2.2. Produtos de degradação térmica de Estreptomicina e Diidroestreptomicina

A STRE apresenta um produto de degradação térmica (70 °C) em pH neutro (em água) com uma degradação superior a 90% em 24 horas de aquecimento.

Presume-se que o pico 1 (**Figura 28**) corresponda a estreptobiosamina, a qual é o produto mais abundante de degradação da STRE (Hanko e Rohrer, 2007), e este

composto também é relatado como impureza majoritária nos medicamentos a base de STRE. A USP estabelece que o tempo de retenção ajustado mínimo para a impureza majoritária deve ser de 0,5. Nas condições otimizadas no presente trabalho foi obtido um valor de 2,5, e uma resolução maior que 3 entre o produto de degradação e a STRE.

A análise foi realizada também para soluções de DHS e se verificou que este é estável, mesmo depois de 24 horas de aquecimento a 70 °C (resultados não apresentados).

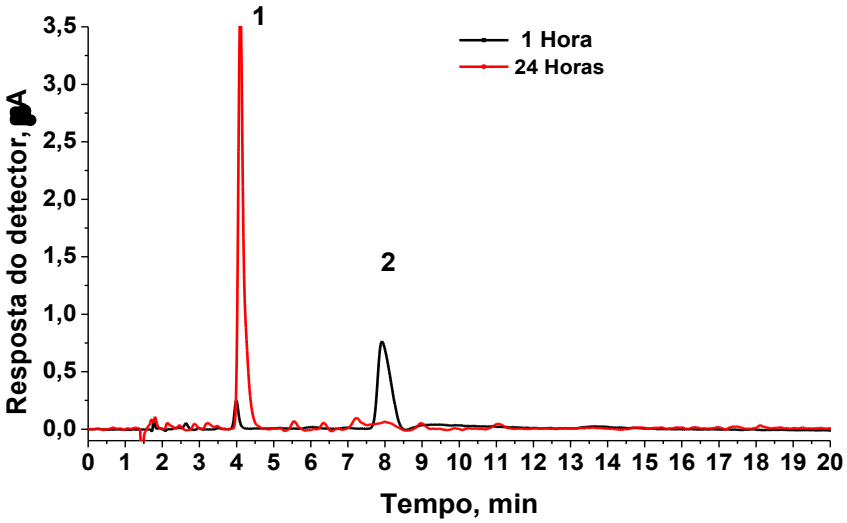

Figura 28. Cromatogramas das soluções de STRE submetidas à temperatura de 70 °C após o período de 1 hora e 24 horas. A impureza majoritária é o pico 1 e a STRE o pico 2. Condições cromatográficas: coluna CarboPac PA1, eluição isocrática com FM NaOH 0,07 mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}. Volume de injeção: 20 µL. Detecção amperométrica pulsada: E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,65 V aplicado durante 200 ms. Concentração de STRE: 30 µg mL^{-1}.

4.2.3. Conformidade do sistema cromatográfico

A STRE e DHS encontram-se associadas na grande maioria dos medicamentos veterinários comercializados no mercado nacional. Dessa forma foi desenvolvido um método de cromatografia líquida associada à detecção amperométrica no modo

pulsado para a quantificação dos dois ativos em conjunto, usando como padrão interno o padrão de glicose.

Embora, os resultados em termos de repetitividade foram satisfatórios como um desvio padrão relativo inferior ao 3% (**Tabela 15**), é conhecido que uma limitação associada à detecção eletroquímica é a instabilidade do sinal eletroquímico em função do tempo, podendo comprometer a repetibilidade da resposta. A repetitividade dos resultados pode ser afetada por variações na vazão, na temperatura, no volume de injeção, diferença na força iônica entre as soluções padrões e amostras e inserções acidentais de bolhas de ar na solução transportadora. Além disto, à adsorção de produtos ou impurezas na superfície dos eletrodos sólidos é uma limitante para manutenção e/ou renovação da superfície eletródica. Por isso, a implementação do método do padrão interno em sistemas de HPLC com detecção amperométrica é uma boa estratégia para contornar estas limitações, uma vez que, as correntes do analito e do padrão interno são afetadas similarmente por variações destes parâmetros no transcorrer do experimento. No método desenvolvido foi introduzida a glicose como padrão interno de maneira que a possível influência de variações nos parâmetros citados anteriormente pudesse ser corrigida com base nas variações (de mesma intensidade) observadas no sinal do padrão interno. Cabe destacar que nem a Farmacopeia Americana (USP, 2010) nem outros autores consideraram o uso de padrão interno na análise de aminoglicosídeos.

Os parâmetros de conformidade cromatográficos obtidos (**Tabela 16**) se enquadram nas especificações da Farmacopeia Americana que estabelece que a eficiência da coluna não seja inferior a 1000 pratos, o fator de assimetria não seja maior que 2 e que a estimativa do desvio padrão relativo para replicatas de injeções (n=6) não seja maior que 5,0%.

Tabela 16. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos para a STRE e DHS nas condições otimizadas.

Principio ativo	N	RSD[a],%	As[a]	T_R'	k
Estreptomicina	2438	2,7	1,25	6,29	3,7
Diidroestreptomicina	2722	2,5	1,28	11,76	6,9

[a] Seis replicatas, N= Número de pratos, RSD= estimativa do desvio padrão relativo, As= fator de assimetria; k fator de retenção; t_R': tempo de retenção ajustado.

Na **Figura 29** é mostrado um cromatograma obtido na condição otimizada, empregando a glicose (GLU) como padrão interno.

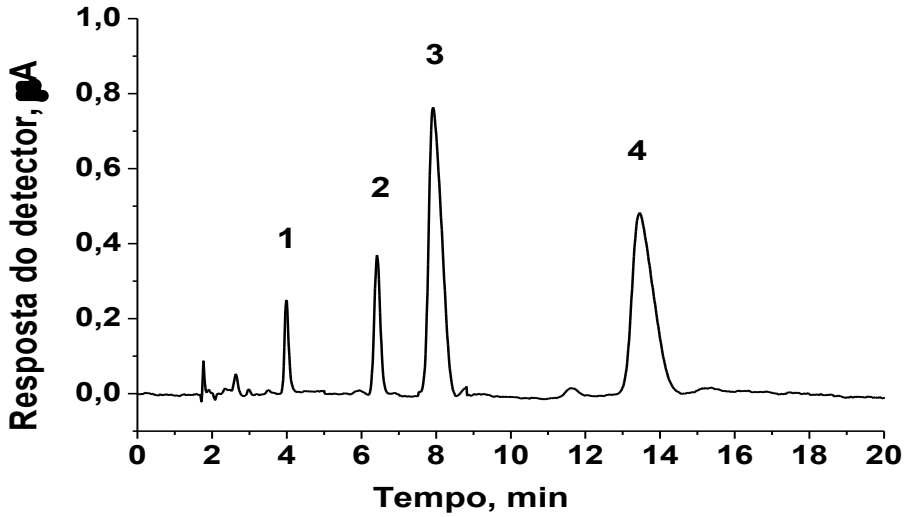

Figura 29. Cromatograma obtido para a separação de DHS (4), STRE (3), padrão interno GLU (2), impureza majoritária da STRE (1). Condições cromatográficas: coluna CarboPac PA1, eluição isocrática com FM NaOH 0,070 mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}. Volume de injeção: 20 µL. Detecção amperométrica pulsada: E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,65 V aplicado durante 200 ms. Concentração do STRE e DHS de 20 µg mL^{-1} e a de glicose e 0,5 µg mL^{-1}.

4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO E PARÂMETROS DE CONFORMIDADE DO SISTEMA

4.3.1. Estabilidade das soluções de STRE e DHS

Foram feitos estudos referentes à estabilidade das soluções padrão de STRE e DHS utilizadas na rotina analítica, uma vez que uma possível degradação do analito durante a estocagem pode afetar a exatidão dos resultados e não se tem informação a respeito ao prazo de validade das mesmas.

O guia de validação do MAPA não estabelece parâmetros específicos para os estudos de estabilidade, mas indica um máximo admissível de 2% de degradação em relação a uma solução padrão recém preparada. No estudo realizado foi avaliada a estabilidade dos padrões em termos de temperatura, luminosidade e tempo, simulando as condições nas quais os padrões são armazenados no laboratório na rotina, durante um período de até 90 dias.

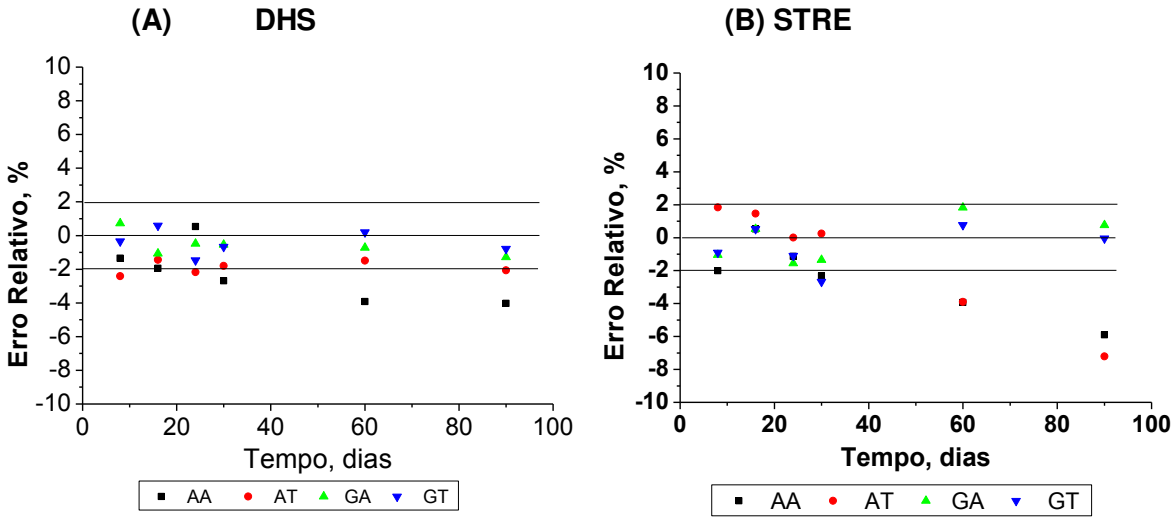

Figura 30. Estabilidade da solução estoque de (A) DHS e (B) STRE armazenadas à temperatura ambiente em frascos transparentes (AT); âmbar (AA) e em geladeira a 4 °C, em frasco transparente (GT) e em frasco âmbar (GA).

As soluções estoque de STRE armazenadas em frasco âmbar e em frasco não âmbar e temperatura ambiente são consideradas estáveis por um período de apenas 30 dias (erro relativo < 2%, **Figura 30**). Após este período, no cromatograma se observa um novo pico correspondente ao produto de degradação, o que confirma a não estabilidade das soluções após este tempo. Entretanto, quando estocadas em geladeira as soluções padrão são estáveis até 90 dias.

A solução estoque de DHS pode ser estocada na geladeira em frasco âmbar ou não âmbar, por um período máximo de 90 dias sem apresentar produtos de degradação dentro do erro aceitável pelo guia de validação. Estes resultados de estabilidade são válidos para soluções de concentração iguais ou superiores a 100 μg mL^{-1}. Segundo os resultados, não é aconselhável estocar estas soluções a temperatura ambiente.

Portanto, para garantir a estabilidade e obter confiabilidade e repetibilidade dos resultados, as soluções estoque dos AG em estudo foram preparadas em água purificada em sistema Milli-Q, armazenadas em frasco âmbar, estocadas a 4°C por um tempo máximo de três meses e as soluções de trabalho foram preparadas diariamente a partir das respectivas soluções estoque.

4.3.2. Seletividade do método

A seletividade do método é a capacidade que o método possui de identificar um composto inequivocamente na presença de outros componentes (impurezas, componentes da matriz e/ou produtos de degradação). Entretanto, o guia de validação apesar de exigir a avaliação de este parâmetro, não fornece as diretrizes necessárias para sua execução, uma vez que não contempla situações nas quais não se tem disponível a matriz branca do medicamento.

O guia propõe que a seletividade seja determinada pela comparação dos resultados obtidos na análise de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Porém, acrescenta que, quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, podem-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado, por exemplo, metodologia farmacopeica ou outro procedimento validado. Nestas comparações, devem estar incluídas amostras armazenadas sob condições de estresse (por ex. luz, calor umidade, hidrólise ácida / básica, oxidação).

A seletividade neste trabalho foi avaliada através do estudo de degradação do fármaco em condições extremas (meio ácido, meio básico, meio oxidante e meio aquecido 60 °C) em dois diferentes períodos: uma hora após o preparo das soluções e depois de 24 horas.

Não se optou por realizar estes estudos com o medicamento, uma vez que teria que ser realizado para cada formulação, o que iria demandar muito tempo e não traria informações relevantes, posto que de modo geral as substâncias do excipiente são estáveis ou não eletroativas.

Através deste estudo foi verificado que a STRE é instável no meio ácido com diminuição do sinal de 28% após 24 h. Em adição, no meio básico e submetido a 60 ºC durante 24 horas a STRE apresentou produtos de degradação eletroativos (cromatogramas apresentados na **Figura 31**). Porém não houve presença de interferentes ou produtos de degradação no mesmo tempo de retenção da STRE em nenhuma das condições de estresse e nos tempos estudados, conferindo seletividade ao método.

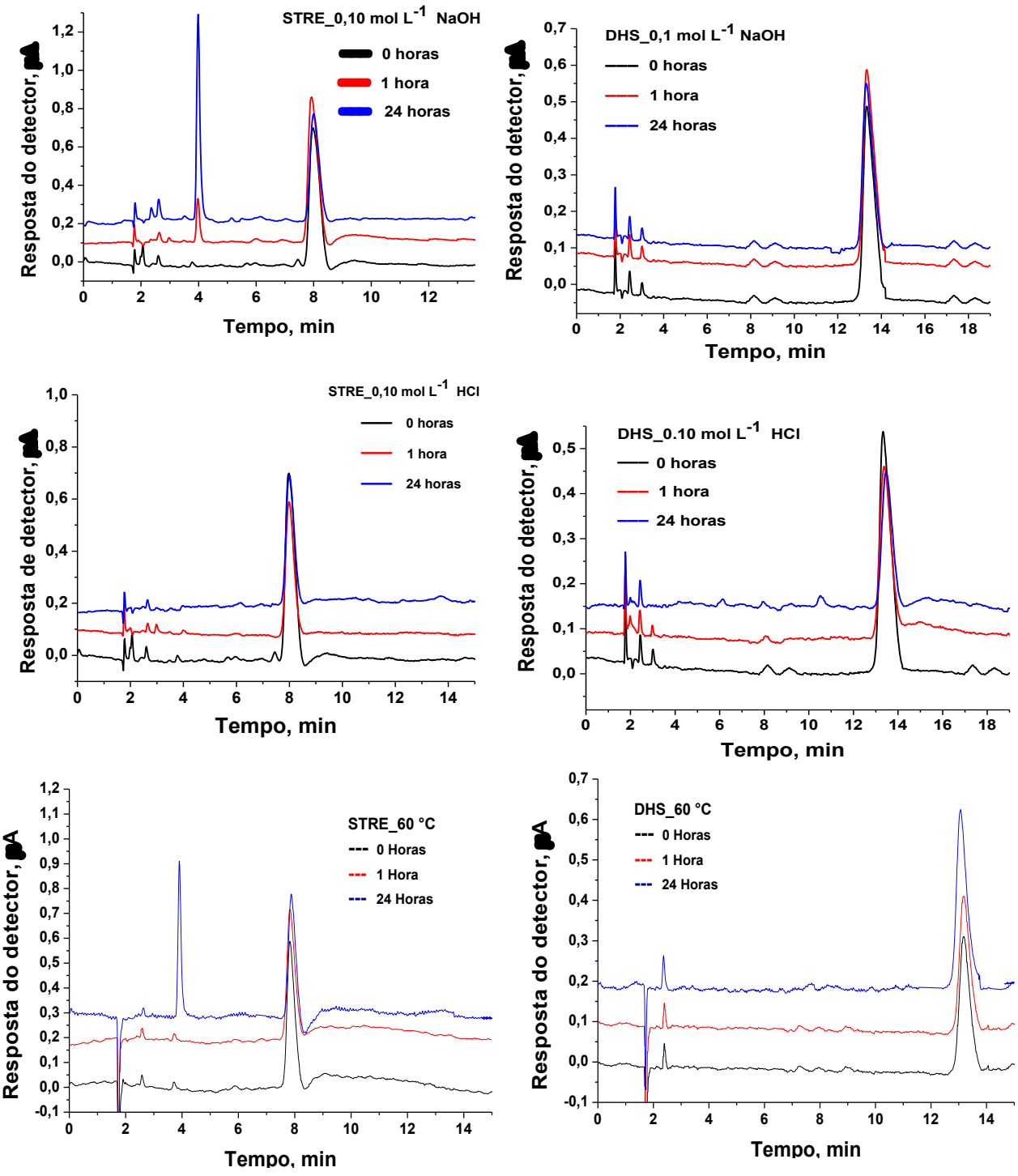

Figura 31. Cromatogramas das soluções de trabalho recém preparadas (controle) e das soluções de STRE e DHS submetidas às condições de estresse, após o período de 1 hora e 24 horas. Condições cromatográficas: coluna CarboPac PA1, eluição isocrática com FM NaOH 0,07 mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}. Volume de injeção: 20 µL. Detecção amperométrica pulsada: E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,65 V aplicado durante 200 ms. Concentração do STRE e DHS: 20 µg mL^{-1}.

Os resultados obtidos demonstraram também que não houve eluição de interferentes no mesmo tempo de retenção da DHS, em nenhuma das condições de estresse e nos tempos estudados. Além disso, é observado que não houve diminuição significativa da área do pico cromatográfico da DHS nos meios básico e meio aquecido a 60 °C. No meio ácido, o sinal apresenta diminuição de 30% após uma hora.

Não foi possível avaliar os produtos de degradação no meio oxidante uma vez que após diluir o analito a 20 µg mL^{-1} em água, a concentração de peróxido de hidrogênio é tão alta que impossibilita a determinação dos analitos, uma vez que o peróxido de hidrogênio é eletroativo.

Com respeito aos analitos associados nas formulações farmacêuticas: penicilina G procaínica, penicilina G benzatínica, penicilina G potásica, prednisolona e piroxicam foi comprovado que estes não apresentam detecção nas condições do método e, portanto, não são interferentes.

Os resultados obtidos comprovaram que o método é seletivo frente às condições avaliadas nos parâmetros cromatográficos previamente otimizados.

4.3.3. Curva analítica

Inicialmente foi construída uma curva dinâmica no solvente para a STRE e DHS por padronização interna (**Figura 32**) no intervalo de concentração de 1 a 50 µg mL^{-1}, a fim de avaliar a faixa de trabalho do método. Observa-se que a resposta do detector não é linear em toda a faixa de concentração avaliada. Em baixas concentrações (menores do que 10 µg $mL^{-}1$) a resposta eletroquímica aumenta exponencialmente com a concentração e em concentrações superiores a 40 µg mL^{-1} a área do pico passa a independer da mesma. Portanto, a partir dos resultados obtidos optou-se por

trabalhar numa faixa de concentração de 10 a 30 µg mL^{-1} para os dois analitos, mantendo a concentração do padrão interno em 0,5 µg mL^{-1}.

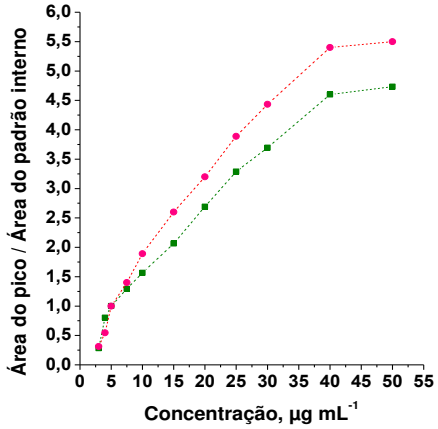

Figura 32. Curva dinâmica no solvente para (-■-)STRE e (-■-)DHS

Para avaliar a linearidade do método foi construída uma curva analítica de trabalho no solvente, no intervalo de concentrações de 50 a 150% em relação à concentração teste, em 5 níveis de concentração (*I=5*), preparadas em triplicatas independentes (J=3) e duplicatas de injeção (L=2) para um total de 30 respostas instrumentais (5 x 3 x 2), dentro do intervalo de concentrações da faixa linear. Cabe resaltar, que o Guia de validação do MAPA não especifica a faixa de concentração da curva analítica. A ANVISA (Resolução 899, de 29 de Maio de 2013) estabelece uma faixa de 80 a 120%. No entanto, essa faixa é bastante estreita e dificulta o procedimento de adição de padrão na análise de amostras e, portanto, neste trabalho, foi definida a faixa ótima no intervalo de 50 a 150% da concentração teste.

Na **Figura 33 (a e b)** são mostradas as curvas analíticas de trabalho construídas com as 30 soluções dos padrões de STRE e DHS, usando como padrão interno a glicose na concentração de 0,5 µg mL^{-1}. Também, nesta **Figura 33 (c e d)** estão apresentados os respectivos gráficos de resíduos.

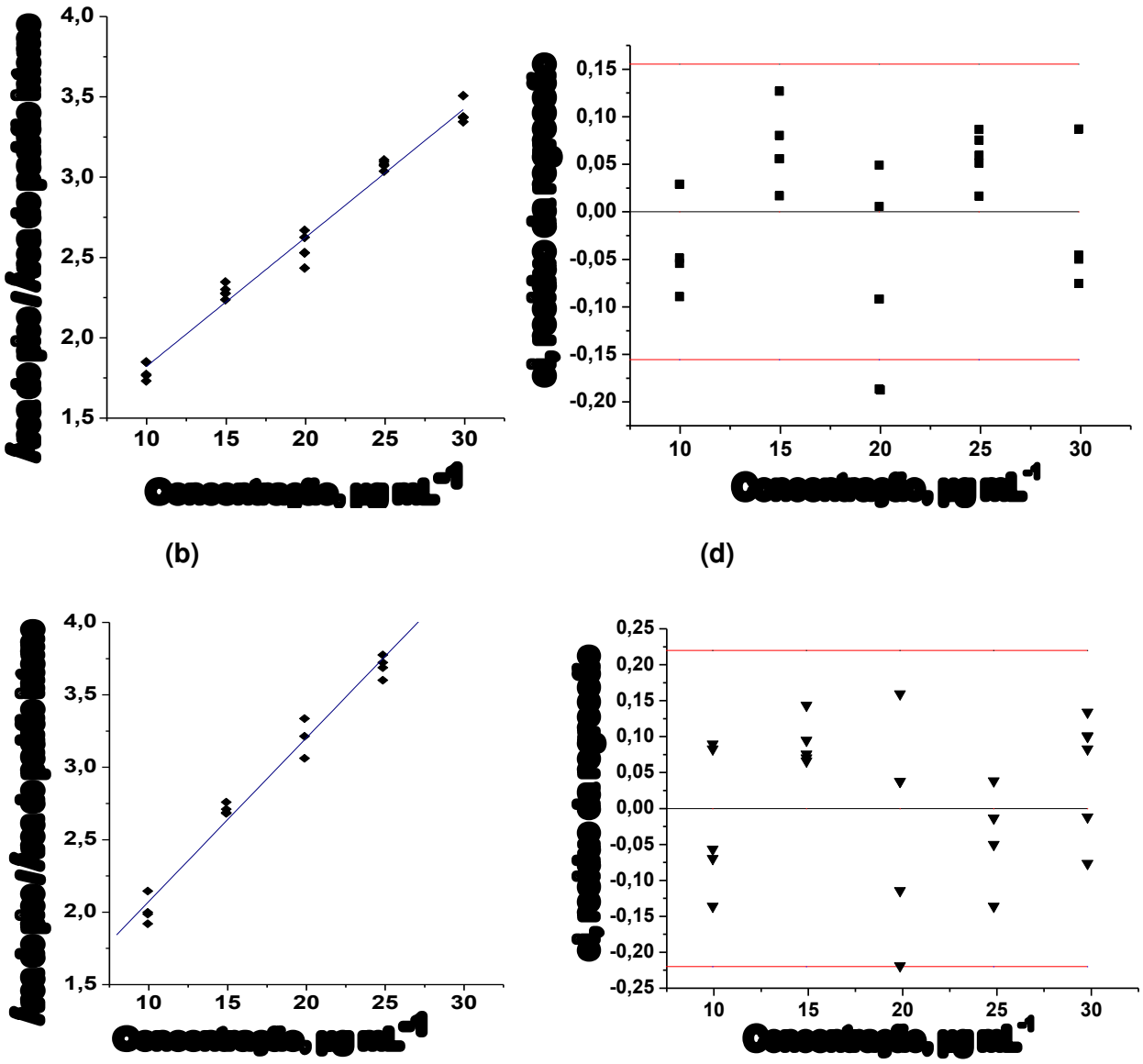

Figura 33. Curva analítica de trabalho por padronização interna de (a) STRE e (b) DHS, nas concentrações de 10, 15, 20, 25, 30 µg mL^{-1}. Gráfico de resíduos para as curvas de (c) STRE e (d) DHS. O padrão interno foi adicionado na concentração 0,5 µg mL^{-1} (as líneas em vermelho indicam a variação aceitável baseado no critério $t_{(1-\alpha/2;\ n-2)} * S_{res}$)

As curvas analíticas no solvente obtidas por padronização interna foram estatisticamente avaliadas, conforme preconiza o Guia de Validação do MAPA quanto a possível presença de valores extremos (teste de significância dos resíduos e teste de Jacknife) e a homocedasticidade (teste de Levene).

Os valores considerados tendências baseados no critério $t_{(1-a/2;\ n-2)}$*S_{res} (**Figura 33**), foram confirmados como *outliers* pelo método dos resíduos padronizados Jacknife, cuja estatística é o resíduo J_{ei}, o qual foi calculado para cada ponto da curva analítica, conforme descrito pela **Equação 2.**

$$J_{ei} = r_i \sqrt{\frac{n-p-1}{n-p-r_i^2}} \quad \textbf{Equação 2}$$

Sendo, p= número de níveis de concentração (5 níveis), n = número total de respostas instrumentais (n= 30), $r_i = \frac{e_i}{s_{ei}}$ resíduo padrão do resíduo, $s_{ei} = s_{res}\sqrt{1 - h_i}$, $h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})}{s_{xx}}$, s^2_{res} é a variância dos resíduos da regressão, x_i nivel de concentração (de Souza, 2007).

Ao comparar o valor de J_{ei} calculado para cada ponto com o valor de $t_{(1-\ \alpha;\ n-p-1)}$ tabelado, se verificou que das 30 respostas instrumentais da curva no solvente para STRE dois valores são extremos e, portanto, foram eliminados. No caso de DHS só um *outlier* foi identificado a um nível de confiança de 95%. Para cada dado eliminado, o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) foi realizado novamente Finalmente na inspeção visual dos gráficos dos resíduos da regressão não foram observadas tendências após o tratamento dos valores extremos nas curvas.

A premissa da metodologia MMQO de que os resíduos das regressões devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste de homocedasticidade de Levene. No teste de Levene, os resíduos são divididos em dois grupos de tamanho n_1 e n_2, equilibrando a distribuição dos pontos entre os grupos em função dos níveis de concentração x_i estudados, sem separar as replicatas de um mesmo nível em grupos diferentes. As medianas dos resíduos de cada grupo $\widetilde{e_1}$ e $\widetilde{e_2}$ são calculadas, e os valores absolutos das diferenças entre os resíduos e as medianas dos respectivos grupos $d_{i1} = |\widetilde{e_1} - e_{i1}|$ e $d_{i2} = |\widetilde{e_1} - e_{i2}|$ são obtidos. Finalmente, a média das

diferenças ($\overline{d_j}$) e a soma dos quadrados dos desvios (SSD_j) dos valores d_{ij} de cada grupo $j = 1$ e $j = 2$ são calculados (**Tabela 17**). A estatística de Levene (t_L) é avaliada pela **Equação 3**.

$$t_L = \frac{\overline{d_1} - \overline{d_2}}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) s_p^2}} \qquad \textbf{Equação 3}$$

onde, t_L é a estatística *t* de Levene, $\overline{d_j} = \sum \left| \widetilde{e_j} - e_{ij} \right| / n_j$ a média dos módulos das diferenças entre cada resíduo e a mediana de cada grupo $j = 1$ e $j = 2$, n_j é o número de observações em cada grupo, $\widetilde{e_j}$ é a mediana de cada grupo, $s_p^2 = \frac{SSD_1 - SSD_2}{n_1 + n_2 - 2}$ são as variâncias combinadas, SSD_j é a soma dos quadrados dos desvios de d_{ij} para cada grupo e $d_i = \left| \widetilde{e_j} - e_{ij} \right|$ é o módulo da diferença entre cada resíduo e o grupo de mediana.

Tabela 17. Análise de variância para estimativa de estatística de Levene, para a curva no solvente de STRE.

Estatística	**n_1**	**n_2**
Número de pontos no grupo (resíduos da regressão), n_j	16	12
Mediana dos resíduos da regressão, $\widetilde{e_j}$	0,010	0,029
Soma dos quadrados dos desvios entre os resíduos e as medianas dos residuos dos respectivos grupos, SSD_j	0,066	0,051
$\overline{d_j} = SSD_j / n_j$	0,055	0,058
Variância combinada, s_p^2	0,004	
t_{Levene}	-0,123	
$t_{(1-\alpha/2)}$ para n_1+n_2-2	2,11	

Como é apresentado na **Tabela 17**, neste estudo o teste estatístico (t_L) de cada uma das curvas analíticas não excedeu o valor crítico *de* $t_{(1-\alpha/2;\ n1+n2-2)}$, indicando que a variância dos resíduos é constante, e as curvas são homocedásticas e que a curva linear pode ser calculada seguindo o MMQO.

Dado que todas as curvas analíticas obtidas se mostraram homocedásticas, foi possível estabelecer os coeficientes de regressão linear (a) e o angular (b) das equações das retas empregando o método dos mínimos quadrados ordinários (**Tabela 18**).

Tabela 18. Parâmetros de regressão linear e coeficientes de correlação (r) das curvas obtidas para a STRE e para a DHS com suas incertezas associadas (p=0,05).

Princípio ativo	a, µA (intercepto)	b, µA mL μg^{-1} (coeficiente angular)	r
Estreptomicina	0,99 ± 0,04	0,082 ±0,002	0,995
Diidroestreptomicina	0,95 ± 0,06	0,113 ± 0,003	0,994

O método foi linear na faixa de trabalho de 10 a 30 $\mu g\ mL^{-1}$, com coeficientes de correlação lineares (r) superiores a 0,99. A sensibilidade foi expressa pelo coeficiente angular da reta obtida a partir da regressão linear da curva analítica, cujos parâmetros estão descritos na **Tabela 18**.

4.3.4. Efeito matriz

Todas as amostras de medicamentos de diferentes formulações e/ou fabricantes foram avaliadas quanto a possível presença de efeito matriz. Devido a não disponibilidade das amostras brancas para a obtenção do extrato da matriz branca, o estudo seguiu os parâmetros do guia de validação do MAPA, que estabelece que o efeito da matriz seja determinado por comparação estatística da quantificação das amostras pelos métodos de adição-padrão e curva de calibração em solvente puro. Ambos os métodos incluíram o uso da glicose como padrão interno.

Na **Tabela 19** apresentam-se os resultados obtidos para os dois procedimentos: curva analítica de padronização interna e adição de padrão (com padrão interno),

para as formulações pó solúveis, solução injetável e unguento. Para confirmar a premissa de homogeneidade das variâncias destes resultados foi realizado o teste "F". Uma vez que os resultados deste teste não demonstraram diferenças significativas (p= 0,05), foi possível a comparação das médias dos teores de STRE ou DHS obtidas mediante a curva no solvente e na matriz. Por médio do teste "t". Uma vez que não houve diferença significativa (p= 0,05) entre os teores dos ativos determinados por curva analítica no solvente e pela curva de adição de padrão, conclui-se que não há efeito matriz e que nestas formulações a quantificação pode ser feita mediante curva no solvente, que é um procedimento mais rápido, pois somente requer seis determinações em relação ao método de adição de padrão que requer 30 determinações para a análise de uma amostra.

Tabela 19. Avaliação do efeito da matriz para STRE.

	Amostra	Adição de padrão [a]		Curva no solvente [a]	
		Média, g kg^{-1}	s	Média, g kg^{-1}	s
STRE	1- STRE, pó solúvel	282,9	3,7	278,0	3,1
	4-STRE/DHS, pó solúvel [b]	196,8[b]	2,4	199,2[b]	2,0
	8- STRE, unguento	7,05	0,09	7,13	0,04
DHS	3- DHS, pó solúvel	524,8	13,2	525,0	6,9
	6- DHS, suspensão	82,6	1,4	83,4	0,8
	4-STRE/DHS, pó solúvel	201,4 [b]	3,1	203,9 [b]	2,3

[a] Média de quatro análises por amostra. [b] Média de seis análises por amostra. s: estimativa do desvio padrão.

4.3.5. Precisão

A dispersão de resultados foi estimada entre ensaios independentes, repetidos para uma mesma amostra, em termos de repetitividade (precisão intra-ensaio) e precisão intermediária (precisão inter-ensaio). Para tanto, foram analisadas quatro amostras de diferentes formulações contendo os AG, usando o método de adição padrão. Os resultados foram expressos como a estimativa do desvio padrão relativo (RSD) e estão apresentados na **Tabela 20.** Dos resultados se pode extrair que o método

apresenta um bom desempenho em termos de repetitividade para STRE nas formulações estudadas, dado que seus coeficientes de variação foram menores que dois terços do valor teórico calculado por intermédio da equação de Horwitz, RSD, 1,3% (**Equação 4**). Para a DHS os desvios foram superiores ao limite orientativo do guia. As precisões intermediárias do método em geral foram inferiores a 5%.

$$CV = 2^{(1-0{,}5\ log\ C)} \quad \textbf{Equação 4}$$

Onde, C é a concentração do analito.

4.3.6. Exatidão (veracidade)

O guia não relata o procedimento a ser seguido para avaliação da veracidade/exatidão no caso que não se disponha de material de referência certificado ou da matriz branca (excipiente). Neste trabalho, a exatidão foi avaliada através do teste de recuperação. Sendo assim, medicamentos disponíveis comercialmente foram fortificadas em 3 níveis de concentração: baixa (30%), média (50%) e alta (60%). Todas as análises foram realizadas em quatro replicatas independentes, exceto a amostra 4-STRE/ DHS que foi analisada em sextuplicata.

Tabela 20. Valores obtidos para os ensaios de precisão e exatidão para STRE e DHS.

Amostra	Precisão		Exatidão[c]		
	Intra-ensaio[a] (RSD %)	Inter-ensaio[b] (RSD %)	Nível Baixo (30%)	Nível Médio (50%)	Nível Alto (60%)
1- STRE, Pó solúvel	1,3	2,0	101	100	97
3- DHS, Pó solúvel	2,5	3,9	101	107	99
4- STRE, Pó solúvel	1,2 [a1]	2,7[b1]	101 [c1]	98 [c1]	102 [c1]
4- DHS, Pó solúvel	1,5 [a1]	2,5 [b1]	119 [c1]	96 [c1]	109 [c1]
6- DHS, Suspensão	1,7	1,8	106	100	113
8- STRE, Unguento	1,2	2,4	103	101	105

[a] Precisão intra-ensaio (n = 4, [a1] n = 6). [b] Precisão inter-ensaio (n = 12, [b1] n = 18). [c] Exatidão (% Recuperação, n = 4, [c1]n = 6).

Segundo o Guia de Validação do MAPA, a recomendação para aceitação do valor para a veracidade através do teste recuperação é o previsto pela Equação de Horwitz. Então para as amostras com teor do princípio ativo na faixa de concentração entre 10 g kg^{-1} e 1000 g kg^{-1} (1, 4-STRE e 3,4,6-DHS) o intervalo de recuperação aceitável é de 98 a 102% e para a amostra com teor menor de 10 g kg^{-1} (8-STRE) o intervalo de recuperação aceitável é de 97 a 103%. Ainda, o Guia descreve que valores fora das faixas poderão ser aceitos desde que devidamente justificadas. Das amostras analisadas e apresentadas na **Tabela 20**, apenas uma amostra (4-STRE) se encontra na faixa aceitável nos três níveis de fortificação, conforme preconizado pelo Guia de Validação do MAPA. As demais amostras encontram-se fora da faixa da porcentagem de recuperação aceita, em pelo menos em um dos níveis.

4.3.7. Robustez

O guia recomenda para a avaliação da robustez, identificar os possíveis fatores que possam influenciar os resultados, e realizar pequenas variações no valor nominal de cada fator em pelo menos dois níveis.

A robustez foi avaliada segundo o planejamento fatorial Plackett-Burman, medindo a influência de sete variáveis independentes na resposta cromatográfica. Os fatores avaliados estão apresentados na **Tabela 5**. Os experimentos (**Tabela 21**) foram realizados em ordem aleatória e em duplicata (n = 2) e a concentração de STRE e DHS utilizada para a realização do ensaio foi de 20 $\mu g\ mL^{-1}$.

Tabela 21. Fatores avaliados no ensaio de robustez para STRE e DHS.

Fatores avaliados							Experimento	Resposta, área cromatográfica	
A	B	C	D	E	F	G		STRE	DHS
+	+	+	+	+	+	+	1	3,83	4,46
+	+	-	+	-	-	+	2	3,67	4,46
+	-	+	-	+	-	+	3	2,36	4,46
+	-	-	-	-	+	+	4	2,34	4,38
-	+	+	-	-	+	-	5	1,45	5,01
-	+	-	-	+	-	-	6	1,53	5,00
-	-	+	+	-	-	-	7	3,12	4,10
-	-	-	+	+	+	-	8	3,39	4,11

Experimentos (+) correspondem aos valores nominais, Experimentos (-) correspondem aos valores que foram variados. (A) Concentração de NaOH na fase móvel, (B)Tempo de integração do sinal no pulso amperométrico, (C) Potencial de determinação do sinal no pulso amperométrico, (D) Lote da coluna de separação cromatográfica, (E) Tempo do ultrasom no preparo da amostra, (F) Solvente para solubilização da amostra, (G) Potencial de ativação do sinal no pulso amperométrico.

Com estes experimentos foram estimados os efeitos dos fatores de acordo com a **Equação 5**.

$$E_X = \frac{\Sigma Y_{(+)} - \Sigma Y_{(-)}}{N/2} \qquad \textbf{Equação 5}$$

onde, ΣY(+) e ΣY(-) representam as somas das respostas em que o fator X é do nível (+) e (-), respectivamente; e N é o número de experimentos realizados.

Foram construídos os gráficos de Pareto dos efeitos padronizados para os AG individualmente. Estes efeitos padronizados são calculados mediante o cociente do efeito de cada fator (E_x) e o erro associado. Para considerar a significância estatística destes fatores o valor do efeito padronizado foi comparado com o valor de $t_{crítico}$ tabelado que é de 2,036 para 8 graus de liberdade (graus de liberdade associados ao erro padrão de cada efeito).

Na **Figura 34** pode se observar que para os dois AG, os fatores que provocam um efeito significativo são aqueles relacionados ao preparo da amostra como a solubilização da amostra (Fator F) e tempo no ultrassom (Fator E), os quais são facilmente controláveis. Entretanto, também foi significativo o lote da coluna de separação cromatográfica (Fator D) e o fator potencial de ativação do sinal no pulso amperométrico (significativo para DHS). Também foi verificado que os valores da detecção amperométrica (potenciais E_1) são robustos.

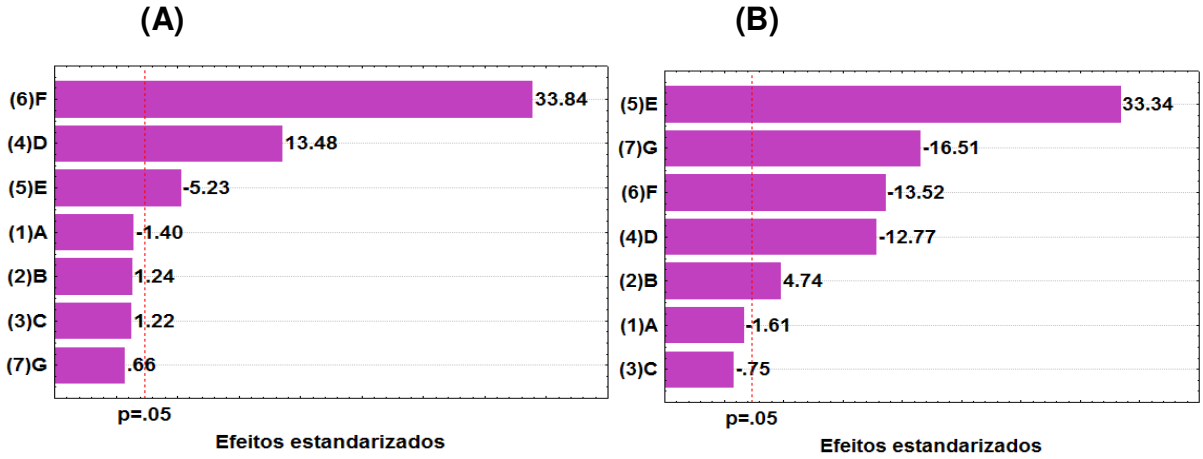

Figura 34. Gráfico de Pareto padronizado do experimento de robustez para (A) STRE e (B) DHS.

O Guia de Validação do MAPA (MAPA, 2011) reporta que caso seja verificado que o método não é influenciado ou é fracamente influenciado por pequenas variações dos fatores, o procedimento analítico é classificado como "Procedimento Analítico Robusto e adequado para as análises de rotina". No entanto, se o método é fortemente influenciado, o procedimento analítico pode ser classificado em uma das seguintes classes: 1) "Procedimento analítico não robusto e inadequado para as análises de rotina", 2) "Procedimento analítico de uso restrito" e 3) "Procedimento analítico não robusto e inadequado para as análises de rotina na faixa de variação estudada dos fatores de influência".

Considerando que muitos dos efeitos avaliados foram significativos para a resposta quantitativa de DHS, o método é considerado não robusto para o intervalo do nível

selecionado para estes fatores na análise do teste de robustez. Ao mesmo tempo, o procedimento analítico é de uso restrito para as análises quantitativas de STRE nas formulações veterinárias avaliadas. Sendo assim, os fatores deverão ser rigorosamente controlados durante as análises, especialmente referente ao preparo da amostra para o uso do procedimento analítico na rotina.

4.4. QUANTIFICAÇÃO DOS AMINOGLICOSÍDEOS: ESTREPTOMICINA E DIIDROESTREPTOMICINA EM AMOSTRAS COMERCIALMENTE DISPONÍVEIS DE MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO

Foram quantificados os teores de STRE e DHS nas amostras dos medicamentos usando o método desenvolvido e validado. Apesar de não ter sido evidenciado efeito matriz em nas amostras em questão, a quantificação dos AG foi feita mediante curvas de adição de padrão (usando glicose como padrão interno), em triplicatas independentes.

A **Figura 35** apresenta cromatogramas das amostras de medicamentos veterinários 2-STRE, 5-STRE/ DHS, 7-DHS e 9-STRE que contem como principal ativo a STRE e a DHS.

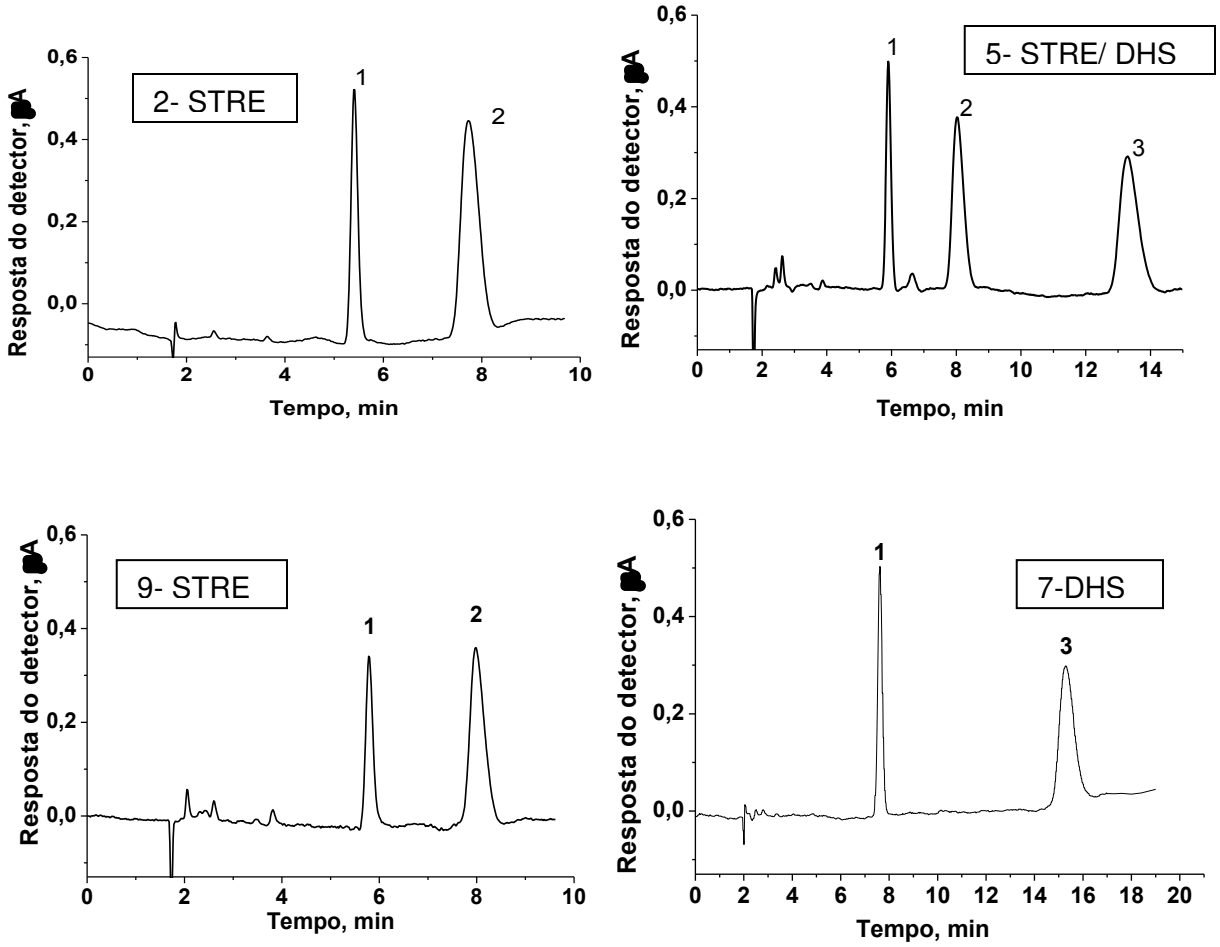

Figura 35. Cromatogramas de amostras de medicamento veterinário contendo STRE (2) e DHS (3) como principal ativo com adição do padrão interno glicose (1). Condições cromatográficas: coluna CarboPac PA1, eluição isocrática com FM NaOH 0,070 mol L^{-1} com vazão de 0,8 mL min^{-1}. Volume de injeção: 20 µL. Detecção amperométrica pulsada: E_1= -0,15 V durante 200 ms (integração do sinal 200 ms), E_2= 0,85 V durante 400 ms e $E_{3=}$ -0,65 V aplicado durante 200 ms. As amostras foram diluídas a 10 µg mL^{-1}.

A **Tabela 22** mostra os resultados obtidos da quantificação de STRE e DHS pelo método de adição de padrão, em 16 amostras de formulações veterinárias, todas adquiridas no mercado nacional. Seguindo a recomendação do Guia de Validação do MAPA (MAPA, 2011), o resultado final foi reportado junto com a incerteza expandida da medição (U, **Equação 6**) . Para o cálculo da incerteza padrão combinado foi utilizada a metodologia *Top-Down,* que considera a incerteza da curva analítica e a incerteza da precisão intralaboratorial. Não foi considerada a incerteza de

amostragem, uma vez que não se tinha esse parâmetro. Para o cálculo da incerteza expandida (U) a **Equação 6** e **Equação 7** foram empregadas.

$$U = \mu(C_{anal}) \times k \qquad \textbf{Equação 6}$$

$$\mu(C_{anal}) = \sqrt{\mu^2_{amostragem} + \mu^2_{repro} + (C_{rec} \times \mu_{rec})^2 + \left(\frac{C_{anal}}{C_{analCC}} \times \mu_{calib}\right)^2} \qquad \textbf{Equação 7}$$

onde: $\mu(C_{anal})$ é incerteza padrão combinada da concentração do analito na amostra analisada, k é o fator de abragencia; C_{anal} é a concentração do analito na amostra analisada; C_{analCC} é a concentração do analito interpolada na curva analítica; μ_{repro} é a incerteza de reprodutibilidade obtida dos ensaios de precisão intermediária; μ_{calib} é a incerteza devido a precisão da concentração do analito na curva analítica; $\mu_{amostragem}$ é a incerteza de amostragem.

O valor da incerteza expandida (U) foi calculada para cada amostra tendo em conta um fator de abrangência de k = 2 (95 % de confiança) (de Souza, 2007).

Entretanto, para avaliar se as amostras estão em conformidade ou não com a especificação do fabricante é necessário definir a faixa aceitável, a qual depende do princípio ativo e da formulação. A monografia oficial da diidroestreptomicina está ausente no compêndio nacional. Apenas a estreptomicina na formulação em solução injetável e em pó estéril para ser reconstituído em água para injeção se encontra disponível, indicando os limites de aceitação de no mínimo 90,0% e, no máximo 115,0% da quantidade declarada no rótulo do medicamento. Esta mesma faixa aceitável é preconizada pela Farmacopeia Americana para estreptomicina.

No caso de diidroestreptomicina a faixa aceitável preconizada pela Farmacopeia Americana é de no mínimo 80,0% e no máximo 120,0% da quantidade declarada no rótulo do medicamento veterinário injetável. Cabe destacar, que a farmacopeia

brasileira não contempla monografias para medicamentos veterinários. No entanto, a ANVISA estabeleceu que na ausência de monografia oficial na Farmacopeia Brasileira, poderá ser adotada monografia oficial da última edição de outros compêndios oficiais. Para as formulações de medicamentos analisados que não existem monografias descritas nas Farmacopeias Americana e Britânica foi adotado o mesmo intervalo.

Tabela 22. Teores médios de STRE e DHS determinados em amostras de medicamentos veterinários.

Amostra	Média ± U[a] g kg^{-1}	Formulação	Concentração Nominal,	Faixa Aceitável (L_{min}- L_{max})
1-STRE	283 ± 18	Pó solúvel	270 g kg^{-1}	243- 311 g kg^{-1}
2-STRE	299 ± 23	Pó solúvel	270 g kg^{-1}	243- 311 g kg^{-1}
3-DHS	525 ± 42	Pó solúvel	538 g kg^{-1}	430-645 g kg^{-1}
4-STRE	199 ± 18	Pó solúvel	213 g kg^{-1}	173-221 g kg^{-1}
5-STRE	192 ± 17	Pó solúvel	213 g kg^{-1}	173-221 g kg^{-1}
4-DHS	201 ± 19	Pó solúvel	213 g kg^{-1}	170-255 g kg
5-DHS	191 ± 17	Pó solúvel	213 g kg^{-1}	170-255 g kg
6-DHS	83 ± 9	Suspensão	80 g L^{-1}	66-99 g L^{-1}
7-DHS	81 ± 9	Suspensão	80 g L^{-1}	66-99 g L^{-1}
8-STRE	7,1 ± 0,7	Unguento intramamário	7 g kg^{-1}	6.3- 8,1 g kg^{-1}
9-STRE	6,6 ± 1,0	Unguento intramamário	7 g kg^{-1}	6,3- 8,1 g kg^{-1}
10-STRE	6,9 ± 1,1	Unguento intramamário	7 g kg^{-1}	6,3- 8,1 g kg^{-1}
11-STRE	7,1 ± 1,0	Unguento intramamário	7 g kg^{-1}	6,3- 8,1 g kg^{-1}
12-STRE	7,3 ± 0,7	Unguento intramamário	7 g kg^{-1}	6,3- 8,1 g kg^{-1}
13-STRE	7,3 ± 0,7	Unguento intramamário	7 g kg^{-1}	6,3- 8,1 g kg^{-1}
14-STRE	6,8 ± 1,4	Unguento intramamário	7 g kg^{-1}	6,3- 8,1 g kg^{-1}
15-STRE	6,8 ±1,0	Unguento intramamário	7 g kg^{-1}	6,3- 8,1 g kg^{-1}
16-STRE	6,6 ± 0,7	Unguento intramamário	7 g kg^{-1}	6,3- 8,1 g kg^{-1}

[a] Média ± U (incerteza expandida)

A interpretação dos resultados das medições foi realizada contemplando bandas de segurança, seguindo o critério apresentado na **Figura 36** (MAPA, 2011)**.** Nesta regra de decisão, o resultado (Res) é comparado com uma faixa com um limite mínimo (L_{min}) e máximo (L_{max}), minimizando assim o risco de falso conforme.

Foi observado que todas as 16 amostras analisadas atingem as especificações determinadas, com teor conforme ao declarado no rótulo (**Tabela 22**).

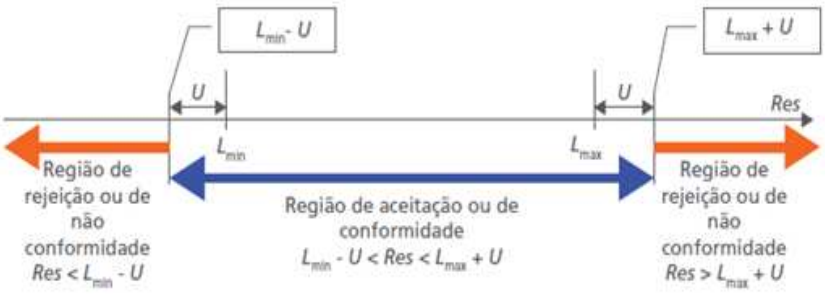

Figura 36. Interpretação de um resultado de medição (adaptado do Manual De Garantia da Qualidade Analítica do MAPA e a Secretaria de Defesa Agropecuária, 2011).

5. CONCLUSÕES

A detecção eletroquímica dos aminoglicosídeos STRE e DHS sob eletrodo de ouro foi possível mediante a aplicação do pulso de potencial triplo. Evidenciou-se a importância do planejamento experimental para estabelecer as condições ótimas de operação do detector amperométrico, uma vez que pequenas variações nos valores destes três potenciais afetam significativamente a resposta analítica destes compostos. Além disso, foi demonstrado que o potencial de limpeza oxidativa estabelecido é adequado para a obtenção de uma resposta repetitiva e sinais de linha de base estáveis. Isso representa uma vantagem, pois elimina a necessidade da abertura frequente da cela para efetuar uma limpeza mecânica ou química da superfície do eletrodo.

Para as análises simultâneas da STRE e DHS foi desenvolvido um método analítico empregando a HPLC-PAD. Para tanto, foi usado uma coluna de troca aniônica com uma fase móvel composta unicamente de hidróxido de sódio (livre de solvente orgânico), o que apresenta vantagem, frente ao descarte e tratamento de resíduos. No entanto, a concentração de hidróxido de sódio precisa ser controlada, pois afeta a separação dos AG.

O método desenvolvido para a quantificação simultânea de STRE e DHS em medicamentos de uso veterinário por HPLC-PAD foi validado conforme especificação do Guia de Validação do MAPA, publicado em 2011. Esse Guia difere do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” publicado pela ANVISA, através da Resolução 899 de 29 de Maio de 2003, para Fármacos de Uso Humano. Cabe destacar, que o Guia do MAPA, de modo geral é muito mais rigoroso do que o Guia da ANVISA quanto ao número de ensaios requeridos e aos critérios de aceitação, principalmente no que concernem aos parâmetros de precisão e exatidão. No

entanto, o guia considera esses critérios de aceitação apenas orientativos, podendo ser justificados quando esses não forem atendidos.

Frente aos parâmetros de validação e critérios de aceitação preconizados o método HPLC-PAD para a determinação de STRE e DHS em medicamentos veterinários se mostrou linear na faixa estabelecida, seletivo frente aos compostos estruturalmente relacionados e/ou associados, além de ser confirmada que a matriz não tem efeito de atenuação ou ganho do sinal de detecção eletroquímica. Entretanto, segundo os critérios do Guia do MAPA, o método desenvolvido não apresentou precisão adequada para todas as formulações, uma vez que estas apresentaram valores de RSD na faixa de 1,8 a 3,9% (inter-ensaio), ou seja, superiores aos preconizados. Em termos de exatidão/veracidade é importante destacar que o Guia não estabelece como realizar o teste sem a disponibilidade de matriz branca ou material de referência certificado. Empregando o teste de recuperação, com três níveis de fortificação, foi verificado que nem todos os valores obtidos se enquadraram dentro das especificações. O não atendimento do parâmetro de exatidão pode ser justificado pelo próprio sistema de detecção. O detector amperométrico não é tão estável quanto um detector de arranjo de fotodiodos.

É importante destacar que o método de cromatografia líquida associada à detecção eletroquímica para a determinação de DHS ainda não foi proposta nas Farmacopeias Brasileira, Britânica e Americana e de acordo aos resultados obtidos neste trabalho este método é adequado e pode ser aplicado com sucesso na rotina de fiscalização de medicamentos veterinários contendo esse princípio ativo. Ainda, como vantagem se destaca que o mesmo método pode ser empregado para a determinação de STRE e DHS.

A padronização interna, usando glicose, apresentou vantagens frente à padronização externa, principalmente pelo sistema de detecção que pode apresentar variações em decorrência da alteração da superfície eletroativa do eletrodo de ouro.

Todas as amostras avaliadas, considerando a incerteza expandida e um fator de abrangência 2, apresentaram o teor de STRE ou DHS dentro das especificações, considerando uma faixa aceitável de 90 a 115% para STRE e 80 a 120% para DHS do valor nominal informado pelo fabricante. Cabe destacar, que é importante que as agências reguladoras (MAPA) estabeleçam os limites de tolerância para que os laboratórios de fiscalização possam tomar decisões quanto à conformidade ou não das amostras analisadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC, 2013. ABIEC divulga resultados da exportação de carne bovina em 2012. Disponível em http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=839#.URT_5G11k_S6g. Acesso em: 08 de fevereiro de 2013

Adams, E., Dalle, J., De Bie, E., De Smedt, I., Roets, E. and Hoogmartens, J., 1997. Analysis of kanamycin sulfate by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection, *Journal of Chromatography A,* 766**,** 133-139.

Adams, E., Puelings, D., Rafiee, M., Roets, E. and Hoogmartens, J., 1998. Determination of netilmicin sulfate by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection, *Journal of Chromatography A,* 812**,** 151-157.

Adams, E., Rafiee, M., Roets, E. and Hoogmartens, J., 2000. Liquid chromatographic analysis of streptomycin sulfate, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 24**,** 219-226.

Adams, E., Roets, E. and Hoogmartens, J., 1999. Liquid chromatographic analysis of dihydrostreptomycin sulfate, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 21**,** 715-722.

Adams, E., Schepers, R., Roets, E. and Hoogmartens, J., 1996. Determination of neomycin sulfate by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection, *Journal of Chromatography A,* 741**,** 233-240.

Alan, H., 1999. High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE- PAD). *Complex Carbohydrates in Foods* CRC Press.

Almeling, S., Ilko, D. and Holzgrabe, U., 2012. Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 69**,** 50-63.

Andreotti, R. and Franceschi, M., 2004. Uso de Antimicrobianos na Produção de Bovinos e Desenvolvimento de Resistência. Documentos 144. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. EMBRAPA. ISSN 1517-3747 Novembro, 2004. Disponível em http://www.infoteca.cnptia. embrapa.br/bitstream/doc/4769 1/1/FL169 3200 4.pdf. Acesso em: 15 de novembro 2011.

Bennett, C.C., 1996. The aminoglycosides, *Primary Care Update for OB/GYNS,* 3**,** 186-191.

Benveniste, R. and Davies, J., 1973. Structure-Activity Relationships Among the Aminoglycoside Antibiotics: Role of Hydroxyl and Amino Groups, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 4**,** 402-409.

Borges, J. and Marques, R., 2010. Comportamento e impacto ambiental de Antibióticos usados na produção animal Brasileira, *Revista Brasileira Ciencia do Solo*, 34, 601-616.

Bosco, S. M., 2000. *Streptococcus suis* tipo II em suínos e perfil de susceptibilidade a antimmicrobianos, Arquivo Instituto de Biologia**,** São Paulo, 67, 2, 157-160.

British Pharmacopoeia, 2011. Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances and Veterinary.

Burke, L.D., Ahern, A.J. and O'Mullane, A.P., 2002. High energy states of gold and their importance in electrocatalytic processes at surfaces and interfaces, *Gold Bulletin,* 35**,** 3-10.

Burke, L.D., Buckley, D.T. and Morrissey, J.A., 1994. Novel view of the electrochemistry of gold, *Analyst,* 119**,** 841-845.

Cai, Y.Q. and Mou, S.F., 2005. Optimizing the quadruple-potential waveform for the determination of gentamicin sulfate by high performance liquid chromatography with pulsed electrochemical detection, *Chinese Journal of Chemistry,* 23**,** 1207-1212.

Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P. and Phillips, I., 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 52**,** 159-161.

Capanema, L., Velasco, L., Souza J. and Noguti, M., 2007. Panorama Da Indústria Farmacêutica Veterinária. Rio de Janeiro. 2007. Disponível em Web http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/ Arquivos/ conhecimento/bnset/set2506.pdf. Acesso em: 20 de novembro 2011.

Clarke, A.P., Jandik, P., Rocklin, R.D., Liu, Y. and Avdalovic, N., 1999. An integrated amperometry waveform for the direct, sensitive detection of amino acids and amino sugars following anion-exchange chromatography, *Analytical Chemistry,* 71**,** 2774-2781.

Cooper, D.J., 1971. Comparative chemistry of some aminoglycoside antibiotics, *Pure and Applied Chemistry,* 28**,** 455-467.

Davies, J., 2007. In the Beginning There Was Streptomycin. *in Aminoglycoside Antibiotics*, pp. 1-13 John Wiley and Sons, Inc.

Davis, B.D., 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides, *Microbiological Reviews,* 51**,** 341-350.

de Souza, S.V.C. and Junqueira, R.G., 2005. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method, *Analytica Chimica Acta,* 552**,** 25-35.

Demain, A.L. and Inamine, E., 1970. Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase (alpha-d-mannosidase) formation, *Bacteriological Reviews,* 34**,** 1-8.

Ding, Y., Yu, H. and Mou, S., 2004. Optimizing the quadruple-potential waveform for the pulsed amperometric detection of neomycin, *Journal of Chromatography A,* 1039**,** 39-43.

Douville, V., Lodi, A., Miller, J., Nicolas, A., Clarot, I., Prilleux, B., Megoulas, N. and Koupparis, M., 2006. Evaporative light scattering detection (ELSD): a tool for improved quality control of drug substances, *Pharmeuropa Scientific Notes,* 2006**,** 9-15.

Durante-Mangoni, E., Grammatikos, A., Utili, R. and Falagas, M.E., 2009. Do we still need the aminoglycosides?, *International Journal of Antimicrobial Agents,* 33**,** 201-205.

European Pharmacopeia, 2012, 7.8 ,7ª ed., European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg.

European Commission, 2003. Regulation No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition. Disponível em: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUr iServ.do? uri=OJ:L:2003:26 8:0029:0043:EN:PDF. Acesso em: 28 de maio 2013.

Edson, R.S. and Terrell, C.L., 1999. The aminoglycosides, *Mayo Clinic Proceedings,* 74**,** 519-528.

Fanos, V. and Cataldi, L., 2001. Renal transport of antibiotics and nephrotoxicity: A review, *Journal of Chemotherapy,* 13**,** 461-472.

Farmacopeia Brasileira, 2010. 2, 5ª ed., Brasília, ANVISA.

Galanakis, E.G., Megoulas, N.C., Solich, P. and Koupparis, M.A., 2006. Development and validation of a novel LC non-derivatization method for the determination of amikacin in pharmaceuticals based on evaporative light scattering detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 40**,** 1114-1120.

Grahek, R. and Zupančič-Kralj, L., 2009. Identification of gentamicin impurities by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 50**,** 1037-1043.

Guo, M.X., Wrisley, L. and Maygoo, E., 2006. Measurement of tobramycin by reversed-phase high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection, *Analytica Chimica Acta,* 571**,** 12-16.

Hanko, V.P. and Rohrer, J.S., 2007. Determination of streptomycin, dihydrostreptomycin, and impurities using anion-exchange chromatography with electrochemical detection, *LC GC North America***,** 64-64.

Holzgrabe, U., Nap, C.J., Kunz, N. and Almeling, S., 2011. Identification and control of impurities in streptomycin sulfate by high-performance liquid chromatography coupled with mass detection and corona charged-aerosol detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 56**,** 271-279.

Hosokawa, S., Nakamura, K., Fujita, Y., Horiuchi, R. and Yamamoto, K., 2008. Determination of isepamicin in human plasma by HPLC with fluorescence detection after derivatization using 6-aminoquinolyl /-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate, *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* 31**,** 1866-1869.

Hughes, S., Lawrence Meschi, P. and Johnson, D.C., 1981. Amperometric detection of simple alcohols in aqueous solutions by application of a triple-pulse potential waveform at platinum electrodes, *Analytica Chimica Acta,* 132**,** 1-10.

Inchauspé, G., Samain, D., 1984. Use of perfluorinated carboxylic acids in the separation of aminoglycoside antibiotics by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A,* 303, 277-282.

Isoherranen, N. and Soback, S., 1999. Chromatographic methods for analysis of aminoglycoside antibiotics, *Journal of AOAC International,* 82**,** 1017-1045.

Jana, S. and Deb, J.K., 2006. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance, *Applied Microbiology and Biotechnology,* 70**,** 140-150.

Japanese Pharmacopoeia, 2011. Official Monographs, 6ª ed., Pharmaceuticals and Medicals Devices Agency, Japan. Disponível em: http://www.pmda.go.jp/english/pharmacopoeia/online.html. Acesso em: 25 de juhlo 2013.

Jensen, M.B. and Johnson, D.C., 1997. Fast Wave Forms for Pulsed Electrochemical Detection of Glucose by Incorporation of Reductive Desorption of Oxidation Products, *Analytical Chemistry,* 69**,** 1776-1781.

Johnson, D.C. and Lacourse, W.R., 1995. Chapter 10 Pulsed Electrochemical Detection of Carbohydrates at Gold Electrodes Following Liquid Chromatographic Separation, in: Ziad El, R. (Ed.), *Journal of Chromatography Library,* 58**,** 391-429.

Joseph, A. and Rustum, A., 2010. Development and validation of a RP-HPLC method for the determination of gentamicin sulfate and its related substances in a

pharmaceutical cream using a short pentafluorophenyl column and a Charged Aerosol Detector, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 51**,** 521-531.

Kaloyanides, G.J., 1994. Antibiotic-related nephrotoxicity, *Nephrology Dialysis Transplantation,* 9**,** 130-134.

Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, *Ecological Indicators,* 8**,** 1-13.

Kotra, L.P., Haddad, J. and Mobashery, S., 2000. Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 44**,** 3249-3256.

LaCourse, W.R. and Dasenbrock, C.O., 1998. High-Performance Liquid Chromatography-Pulsed Electrochemical Detection for the Analysis of Antibiotics, *Advances in Chromatography,* 38**,** 189-232.

LaCourse, W.R. and Johnson, D.C., 1993. Optimization of waveforms for pulsed amperometric detection of carbohydrates based on pulsed voltammetry, *Analytical Chemistry,* 65**,** 50-55.

LaCourse, W.R., 2009. Advances in Pulsed Electrochemical Detection for Carbohydrates, *Advances in Chromatography,* 47, CRC Press.

Larew, L. and Johnson, D.C., 1989. Concentration dependence of the mechanism of glucose oxidation at gold electrodes in alkaline media, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry,* 262**,** 167-182.

Li, B., Van Schepdael, A., Hoogmartens, J. and Adams, E., 2008. Characterization of impurities in sisomicin and netilmicin by liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* 22**,** 3455-3471.

Long, C., Yang, X., Lee, B. and Ong, C., 2005. Optimizing the Triple-Potential Waveform for the Pulsed Amperometric Detection of Streptomycin, *Analytical Letters,* 38**,** 1759-1767.

Luetzow, M., 2003. Harmonization of exposure assessment for food chemicals: the international perspective, *Toxicology Letters,* 140–141**,** 419-425.

Makovos, E.B. and Liu, C.C., 1986. A cyclic-voltammetric study of glucose oxidation on a gold electrode, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics,* 15**,** 157-165.

MAPA, 2013. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/anima l/qualidade-dos-alimentos/a ditivos-autorizados. Acesso em: 16 de abril de 2013.

MAPA, 2012. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica. Medicamentos Veterinários e Fármacos em Produtos para Alimentação Animal. Disponível em Web http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia2e%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de20qualidade%20analitica.pdf. Acesso em: 12 de maio 2012.

MAPA, 2011. Manual de garantia da qualidade analítica. Residuos e contaminantes em alimentos Disponível em Web http://biblioteca quimicaufmg2010.files.wordpress.com/2012/02/mapa-2011-manual-de-garantia-da-qualidade-analitica.pdf. Acesso em: 28 de maio 2013.

Marshall, B.M. and Levy, S.B., 2011. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health, *Clinical Microbiology Reviews,* 24**,** 718-733.

McDermott, P.F., Zhao, S., Wagner, D.D., Simjee, S., Walker, R.D. and White, D.G., 2002. The food safety perspective of antibiotic resistance, *Animal Biotechnology,* 13**,** 71-84.

Megoulas, N.C. and Koupparis, M.A., 2005. Development and validation of a novel HPLC/ELSD method for the direct determination of tobramycin in pharmaceuticals, plasma, and urine, *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 382**,** 290-296.

Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y. and Tulkens, P.M., 1999. Aminoglycosides: activity and resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 43**,** 727-737.

Nikolaeva, N.N., Khazova, O.A. and Vasil'Ev, Y.B., 1983. *Elektrokhimiya,* 19**,** 1042-1048.

Oliveira, A., 2002. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro frente a amostras de Sthaphylococcusspp isoladas de mastite subclínica bovina, no agreste maridional de Pernambuco. A Hora Veterinária, 22, 127, 8-10.

Orgovan, G. and Noszal, B., 2012. NMR analysis and site-specific protonation constants of streptomycin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 59**,** 78-82.

Pasta, M., La Mantia, F. and Cui, Y., 2010. Mechanism of glucose electrochemical oxidation on gold surface, *Electrochimica Acta,* 55**,** 5561-5568.

Pendela, M., Hoogmartens, J., Van Schepdael, A. and Adams, E., 2009. Characterization of dihydrostreptomycin-related substances by liquid chromatography coupled to ion trap mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* 23**,** 1856-1862.

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R. and Waddell, J., 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 53**,** 28-52.

Polta, J.A., Johnson, D.C. and Merkel, K.E., 1985. Liquid chromatographic separation of aminoglycosides with pulsed amperometric detection, *Journal of Chromatography,* 324**,** 407-414.

Pyun, C.W., Abd El-Aty, A.M., Hashim, M.M.M., Shim, J.H., Lee, S.K., Choi, K.D., Park, K.H., Shin, H.C. and Lee, C., 2008. Monitoring of streptomycin and dihydrostreptomycin residual levels in porcine meat press juice and muscle via solid-phase fluorescence immunoassay and confirmatory analysis by liquid chromatography after post-column derivatization, *Biomedical Chromatography,* 22**,** 254-259.

Rocklin, R.D., Clarke, A.P. and Weitzhandler, M., 1998. Improved long-term reproducibility for pulsed amperometric detection of carbohydrates via a new quadruple-potential waveform, *Analytical Chemistry,* 70**,** 1496-1501.

Samain, D., Dupin, P., Delrieu, P. and Inchauspe, G., 1987. Multidimensional ion-pair HPLC for the purification of aminoglycoside antibiotics with refractive index detection, *Chromatographia,* 24**,** 748-752.

Sarmah, A.K., Meyer, M.T. and Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment, *Chemosphere,* 65**,** 725-759.

Sarri, A.K., Megoulas, N.C. and Koupparis, M.A., 2006. Development of a novel method based on liquid chromatography-evaporative light scattering detection for the direct determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in raw materials, pharmaceutical formulations, culture media and plasma, *Journal of Chromatography A,* 1122**,** 275-278.

Schwarz, S. and Chaslus-Dancla, E., 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance, *Veterinary Research,* 32**,** 201-225.

Shabir, G.A., 2003. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *Journal of Chromatography A,* 987**,** 57-66.

SINDAN, 2012. Sindicato Nacional da Industria de Produtos para a Saude Animal. Compêndio de Produtos Veterinários. Disponível em http://www.cpvs.com. br/cpvs/index.html. Acesso em: 15 de junho 2012.

Statler, J.A., 1990. Determination of tobramycin using high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection, *Journal of Chromatography - Biomedical Applications,* 527**,** 244-246.

Streicher, W., Loibner, H., Hildebrandt, J. and Tunrowsky, F., 1983. Synthesis and structure/activity relationships of new guanidino derivatives of aminoglycoside antibiotics, *Drugs under Experimental and Clinical Research,* 98**,** 591-598.

Stypulkowska, K., Blazewicz, A., Fijalek, Z., Warowna-Grzeskiewicz, M. and Srebrzynska, K., 2013. Determination of neomycin and related substances in pharmaceutical preparations by reversed-phase high performance liquid chromatography with mass spectrometry and charged aerosol detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 76**,** 207-214.

Suresh, R. and William, L., 2002. Carbohydrates and Other Electrochemically Active Compounds. *in Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals* CRC Press.

Szúnyog, J., Adams, E., Roets, E. and Hoogmartens, J., 2000. Analysis of tobramycin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 23**,** 891-896.

Umezawa, S., 1974. Structures and syntheses of aminoglycoside antibiotics, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry,* 30**,** 111-182.

USP, 2010. United States Pharmacopeia/National Formulary, United States Pharmacopeial Convention, 26, Rockville, MD.

Van Den Bogaard, A.E. and Stobberingh, E.E., 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans, *International Journal of Antimicrobial Agents,* 14**,** 327-335.

Vassilyev, Y.B., Khazova, O.A. and Nikolaeva, N.N., 1985. Kinetics and mechanism of glucose electrooxidation on different electrode-catalysts: Part II. Effect of the nature of the electrode and the electrooxidation mechanism, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry,* 196**,** 127-144.

Vinas, P., Balsalobre, N. and Hernandez-Cordoba, M., 2007. Liquid chromatography on an amide stationary phase with post-column derivatization and fluorimetric detection for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in foods, *Talanta,* 72**,** 808-812.

Wang, J., Li, Z., Ni, K. and Wang, Z., 2006. Analysis of six aminoglycoside antibiotics and the the impurities by high performance liquid chromatography using electrospray ion trap mass spectrometry, *Chinese Journal of Analytical Chemistry,* 34**,** 979-982.

Wang, J., Wang, D., Ni, K. and Hu, X., 2007. Determination of Four Aminoglycoside Antibiotics by Liquid Chromatography with Pulsed Electrochemical Detection, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies,* 30**,** 1001-1013.

Whall, T.J., 1981. Determination of streptomycin sulfate and dihydrostreptomycin sulfate by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography,* 219**,** 89-100.

ANEXO 1

Tabela 1. Coeficientes de regressão para a resposta área cromatográfica do padrão de DHS.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(7)	p-valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
E1 (L)	-3025,80	307,8538	-9,82870	0,000024	-3753,76	-2297,84
E1 (Q)	-2419,30	338,8380	-7,13999	0,000187	-3220,53	-1618,08
E2 (L)	1711,21	307,8538	5,55851	0,000852	983,25	2439,17
E2 (Q)	-277,12	338,8380	-0,81786	0,440386	-1078,35	524,10
E3 (L)	1237,36	307,8538	4,01930	0,005064	509,40	1965,32
E3 (Q)	-1523,40	338,8380	-4,49594	0,002812	-2324,62	-722,17
E1E2	295,63	402,2304	0,73496	0,486249	-655,50	1246,75
E1E3	3270,63	402,2304	8,13122	0,000082	2319,50	4221,75
E2E3	127,13	402,2304	0,31605	0,761180	-824,00	1078,25

L: linear, Q: quadrático, Os valores em vermelho correspondem aos parâmetros estatisticamente significativos.

Tabela 2. Resumo do analise da regressão, ANOVA para a área cromatográfica do padrão DHS.

Fatores	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcal	p-valor
Regressão	364659610	3	55816741,3	56	0,0003
Resíduos	10754393	10	1075439		
Total	360501316	16			

R^2=0,9702; Ajuste: 0,9527; $F_{3,\ 10;0,05}$ = 3,71

ANEXO 2

Tabela 1. Efeitos estimados do planejamento de otimização, para a resposta do padrão de DHS.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(7)	p-valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
E1 (L)	-1346,53	145,00	-9,29	0,000088	-1701,34	-991,73
E1 (Q)	-1735,58	176,05	-9,86	0,000063	-2166,37	-1304,79
E2 (L)	1137,40	145,00	7,84	0,000227	782,60	1492,21
E2 (Q)	-922,40	176,05	-5,24	0,001940	-1353,19	-491,62
E3 (L)	271,29	145,00	1,87	0,110530	-83,51	626,10
E3 (Q)	-1332,70	176,05	-7,57	0,000276	-1763,49	-901,91
E1E2	527,25	189,45	2,78	0,031871	63,67	990,83
E1E3	1105,00	189,45	5,83	0,001118	641,42	1568,58
E2E3	124,25	189,45	0,66	0,536255	-339,33	587,83

L: linear, Q: quadrático, Os valores em vermelho correspondem aos parâmetros estatisticamente significativos.

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) para a resposta da área cromatográfica da DHS

Fatores	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcal	p-valor
Regressão	106663664	7	15237666,3	42	0,006
Resíduos	2851508	10	356439		
Total	89262299	16			

R^2= 0,968; Ajuste: 0,9401; $F_{6,\ 10;0,05}$ = 3,21