

CONTRIBUIÇÃO AO DOSEAMENTO DE ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS. III. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DA NINIDRINA*

Raul Cesar EVANGELISTA**
Elfrides Eva Scherman SCHAPOVAL***

RESUMO: Os autores testaram em outros antibióticos aminoglicosídicos (amicacina, canamicina, estreptomicina, neomicina e sisomicina) uma adaptação de um método espectrofotométrico de doseamento da gentamicina, visando à análise quantitativa desses princípios ativos em preparações farmacêuticas (solução injetável, pó para injetável e pomada). O método consiste em medir e comparar as densidades ópticas do produto de reação obtido entre as soluções aquosas dos antibióticos (padrões e amostras) e a ninidrina (2,2-diidroxí-1,3-indandiona). Paralelamente, determinou-se a atividade percentual das amostras, por método microbiológico, para comparação dos resultados. Foram obtidos bons resultados nos ensaios da amicacina e da canamicina. O teste com a sisomicina mostrou interesse qualitativo, já que o produto da reação deste antibiótico com a ninidrina apresentou coloração diferente daquela obtida com os outros antibióticos estudados.

UNITERMOS: Antibióticos aminoglicosídicos, doseamento; método espectrofotométrico, ninidrina.

1. INTRODUÇÃO

A reação com a ninidrina (2,2-diidroxí-1,3-indandiona) é típica para a detecção de aminoácidos e aminas, e vem sendo usada com este propósito há mais de cinquenta anos⁵.

Os resultados obtidos por CAMPOS², em sua adaptação ao método de PRISTA⁷, para o doseamento espectrofotométrico da gentamicina, através da comparação das densidades ópticas dos produtos da reação do antibiótico com a ninidrina, mostraram-se reprodutíveis e coerentes com os resultados da avaliação da potência antibacteriana.

Com base no exposto, e levando-se em conta a existência de somente um método

físico-químico de doseamento de antibióticos aminoglicosídicos oficializado^{3,6}, procurou-se, neste trabalho, estender a outros antibióticos desse grupo, em diversas preparações farmacêuticas, a referida adaptação.

Paralelamente, efetuou-se a avaliação da atividade percentual das amostras, através de método microbiológico de cilindros em placas⁴, para comparação dos resultados obtidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As concentrações das soluções dos padrões e das amostras dos antibióticos foram expressas em quantidade da base pura por volume, nos casos da amicacina, canamicina

* Parte do trabalho de dissertação apresentado para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia no Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS — 90.000 — Porto Alegre — RS.

** Departamento de Fármacos e Medicamentos — Faculdade de Ciências Farmacêuticas — UNESP — 14.800 — Araraquara — SP.

*** Departamento de Produção e Controle de Medicamentos — Faculdade de Farmácia — UFRGS — 90.000 — Porto Alegre — RS.

e sisomicina, e em quantidade do sulfato do antibiótico por volume, nos casos da estreptomicina e da neomicina.

2.1. Amostras

Foram utilizadas amostras comerciais dos sulfatos de amicacina (solução injetável), canamicina (solução injetável), estreptomicina (pó para injetável) e sisomicina (solução injetável). Fez-se uso, também, de pomada de neomicina, preparada por BAPTISTA¹, com a seguinte composição: sulfato de neomicina 0,05 g; polietilenoglicol 4000 4,14 g, polietilenoglicol 400 5,81 g. Destas amostras foram preparadas soluções aquosas na concentração de 20 mg/ml.

2.2. Padrões

Foram utilizadas soluções aquosas dos padrões dos antibióticos em estudo na concentração de 20 mg/ml.

2.3. Placas Suporte

Placas de vidro, com 20 cm de lado, cobertas com uma camada de 250 μ de sílica gel G 60.

2.4. Revelador

Foi preparada solução recente, dissolvendo-se 1,0 g de ninidrina em 50 ml de etanol 95% p.a. e 10 ml de ácido acético glacial p.a.

2.5. Ensaio

Para cada determinação, a amostra e o padrão foram aplicados, em triplicata, na placa suporte, por meio de seringa Hamilton, em volumes individuais de 10 μ l, correspondentes a 200 μ g de antibiótico aminoglicosídico na forma de base ou de sulfato. Cada placa permitiu obter seis séries de aplicações, ou seja, seis determinações. Em seguida, a placa foi seca a 100°C, durante 30 minutos, resfriada, nebulizada, do modo mais uniforme possível, com o revelador, seca no-

vamente a 100°C por 10 minutos e resfriada para a fixação da cor. As manchas, de coloração violeta — exceto as obtidas com a sisomicina, que se apresentaram castanhas — foram raspadas para tubos de ensaio secos e agitadas com 5 ml de isopropanol p.a., e quatro gotas de hidróxido de amônio p.a. As suspensões obtidas foram centrifugadas durante 5 minutos, a 3.000 rpm, em centrifugador Excelsa 2-Fanem modelo 205N. As densidades ópticas dos sobrenadantes foram determinadas no comprimento de onda de absorção máxima, conforme preestabelecido pelas curvas de absorção. Como branco, utilizou-se o sobrenadante obtido da raspagem da sílica de fundo, eluída e trabalhada nas mesmas condições.

2.6. Curvas de Absorção

Foram preparados produtos de reação da ninidrina com os antibióticos em estudo, conforme descrito no item 2.5., utilizando-se soluções aquosas dos padrões dos antibióticos na concentração de 20 mg/ml. Usando-se espectrofotômetro Varian série 634 acoplado a registrador, foram obtidas as curvas de absorção dos produtos, no intervalo de 400 a 800 nm. Foram utilizadas cubetas de 1 cm e, como branco, trabalhou-se a sílica de fundo de maneira idêntica. Os comprimentos de onda de absorção máxima, em nanômetros, encontrados para os produtos dos antibióticos e utilizados nos respectivos ensaios foram 411 para a amicacina, neomicina e sisomicina e 577 para a canamicina, conforme indica a Fig. 1.

3. RESULTADOS

A concentração percentual de antibiótico aminoglicosídico foi obtida pela razão entre a média das densidades ópticas das amostras e a média das densidades ópticas dos padrões, multiplicada por 100.

As Tabelas 1 e 2 mostram os resultados obtidos nos ensaios da amicacina e da canamicina, respectivamente.

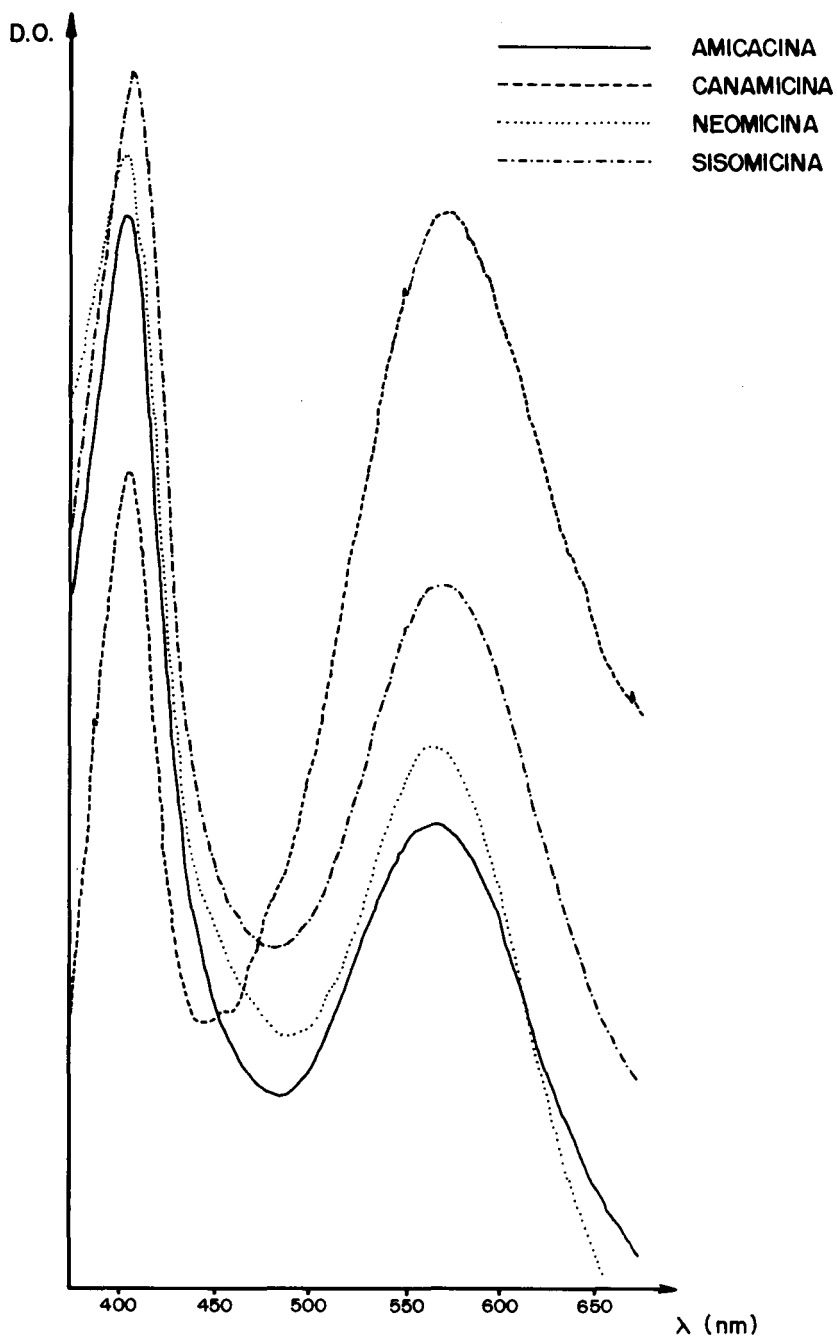


FIG. 1 — Curvas de absorção do produto da reação dos antibióticos aminoglicosídicos e a ninidrina.

TABELA 1 — Amicacina: valores obtidos para a atividade percentual (método microbiológico) e para a concentração percentual (método espectrofotométrico da ninidrina).

Atividade (%) ⁺	Concentração (%) ⁺⁺
112,15	104,53
103,63	102,93
102,51	99,16
107,63	102,43
105,71	103,72
100,98	
$\bar{x} = 105,44$	$\bar{x} = 105,51$

+ Cada valor corresponde à média de duas determinações.
 ++ Cada valor corresponde à média de três determinações.

4. DISCUSSÃO

Apesar dos melhoramentos introduzidos por CAMPOS², o método espectrofotométrico da ninidrina continua requerendo minucioso cuidado técnico na sua execução e um grande número de determinações, para a minimização dos erros.

No presente estudo, conseguiu-se obter resultados compatíveis com os do método microbiológico⁴ nos ensaios da amicacina e da canamicina (Tabelas 1 e 2). As manchas correspondentes à estreptomomicina desenvolveram coloração violácea bastante fraca pela revelação com a ninidrina. Mesmo uma quantidade dez vezes superior àquela normalmente aplicada não produziu coloração suficientemente adequada para uma análise espectrofotométrica do antibiótico.

A reação da sisomicina com a ninidrina foi de particular interesse, pois, embora os resultados não reproduzissem aqueles obtidos pelo método microbiológico, produziu manchas de coloração castanha, nitidamente diferentes das obtidas com os outros antibióticos estudados. A causa deste fenômeno, provavelmente, pode ser explicada pela presença da dupla ligação na estrutura da sisomicina. Tal comportamento pode ser estudado mais detalhadamente, visando a sua apli-

TABELA 2 — Canamicina: valores obtidos para a atividade percentual (método microbiológico) e para a concentração percentual (método espectrofotométrico da ninidrina).

Atividade (%) ⁺	Concentração (%) ⁺⁺
104,84	138,05
113,01	132,46
116,01	98,58
117,86	102,16
119,65	151,52
115,15	
$\bar{x} = 114,43$	$\bar{x} = 116,55$

+ Cada valor corresponde à média de duas determinações.
 ++ Cada valor corresponde à média de três determinações.

cação em testes qualitativos de diferenciação da sisomicina dos outros antibióticos aminoglicosídicos.

5. CONCLUSÕES

Observando-se o desenvolvimento da técnica e os resultados obtidos, concluiu-se que:

1 — A ninidrina pode ser utilizada para o doseamento espectrofotométrico de amicacina e canamicina, matéria-prima ou solução injetável, embora o método exija grande cuidado no seu desenvolvimento e um número elevado de determinações;

2 — A determinação da concentração percentual de amicacina e de canamicina, pelo método espectrofotométrico da ninidrina deve ser sempre comparada à avaliação da potência antibacteriana, pelo método microbiológico dos cilindros em placas;

3 — A reação com a ninidrina poderá ser utilizada como teste qualitativo da sisomicina, por diferenciá-la dos outros antibióticos aminoglicosídicos estudados, e

4 — Existe a possibilidade da aplicação do método espectrofotométrico da ninidrina no doseamento de outros antibióticos aminoglicosídicos.

EVANGELISTA, R.C. & SCHAPOVAL, E.E.S. — Contribution to the quantitative determination of aminoglycosidic antibiotics in pharmaceutical preparations. III. Ninhydrin spectrophotometric assay method. *Rev. Ciênc. Farm.*, São Paulo, 5:29-33, 1983.

ABSTRACT: The authors tested an adaptation of a gentamicin spectrophotometric assay method to other aminoglycosidic antibiotics (amikacin, kanamycin, streptomycin, neomycin, and sisomicin) in order to perform the quantitative analysis of these active principles in pharmaceutical preparations (injectable solution, powder for injection, and ointment). The method consists of measuring and comparing the optical densities of the reactional products obtained from aqueous solutions of the antibiotics (standards and samples) and ninhydrin (2,2-dihydroxy-1,3-indandione). Paralelly, the percentual activity of the samples was determined, by means of microbiological assay method in order to compare the results. Good results were obtained in amikacin and kanamycin assays. The sisomicin test was of qualitative interest, because the reactional product from these antibiotics and ninhydrin showed different colour from that obtained with the other antibiotics studied.

KEY-WORDS: Aminoglycosidic antibiotics, ninhydrin spectrophotometric, assay method.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAPTISTA, E.R. — *Contribuição ao estudo do antibiótico neomicina na forma farmacêutica pomada*. Porto Alegre, Faculdade de Farmácia, UFRGS, 1980. (Dissertação — Mestrado).
2. CAMPOS, L.M.M. — *Contribuição ao controle de qualidade de produtos farmacêuticos contendo o antibiótico gentamicina*. Porto Alegre, Faculdade de Farmácia, UFRGS, 1980. (Dissertação — Mestrado).
3. EUROPEAN pharmacopeia — Paris, Maisonneuve, 1971. v. 2, p. 49-52, 364-7.
4. EVANGELISTA, R.C. & SCHAPOVAL, E.E.S. — Contribuição ao doseamento de antibióticos aminoglicosídicos em preparações farmacêuticas. I. Método microbiológico dos cilindros em placas. *Rev. Ciênc. Farm.*, 5:7-20, 1983.
5. McCALDIN, D. J. — The chemistry of ninhydrin. *Chem. Rev.*, 60: 39-51, 1960.
6. PHARMACOPÉE française — 9. ed., Paris, Maisonneuve, 1972. p. 581-4.
7. PRISTA, L.V.N. — Injetáveis de sulfato de gentamicina. Recife, CEME/LAFEPE, s.d. (relatório).