

CONTRIBUIÇÃO AO DOSEAMENTO DE ANTIBIÓTICOS AMINO GLICOSÍDICOS EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS. II. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DO SULFATO DE COBRE*

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

RESUMO: Os autores testaram em outros antibióticos aminoglicosídicos (amicacina, canamicina, estreptomina, neomicina e sisomicina) uma adaptação de um método espectrofotométrico de doseamento da gentamicina, visando a análise quantitativa desses princípios ativos em preparações farmacêuticas (solução injetável, pó para injetável e pomada). O método baseia-se na formação de complexos coloridos entre os antibióticos aminoglicosídicos e o cobre (II). As densidades ópticas das soluções de complexo de cobre das amostras dos antibióticos foram interpoladas numa curva padrão, constituída pelas densidades ópticas das soluções de complexo de cobre dos padrões dos antibióticos e suas respectivas concentrações. Paralelamente, determinou-se a atividade percentual das amostras, por método microbiológico, para comparação dos resultados. Foram obtidos bons resultados nos ensaios da canamicina e da neomicina.

UNITERMOS: Antibióticos aminoglicosídicos, doseamento; método espectrofotométrico, sulfato de cobre.

1. INTRODUÇÃO

Muitos compostos aminados formam complexos coloridos com metais de transição, particularmente com o cobre^{1, 2, 3, 6, 10, 11, 12, 13, 15}.

A obtenção destes complexos tem servido a vários fins, desde proteção funcional em reações de síntese⁹ até análises quantitativas^{1,2,3,5,11}.

Embora existam vários métodos pesquisados para o doseamento de antibióticos aminoglicosídicos, somente um está oficializado, para a estreptomina^{7,14}.

Os resultados obtidos por CAMPOS⁵, pela adaptação do método de KARTSEVA *et*

*alii*¹¹, para o doseamento espectrofotométrico da gentamicina, mostraram que a técnica de doseamento deste antibiótico em formas farmacêuticas, através da medição da densidade óptica de seu complexo de cobre, é eficiente, reprodutível e de fácil execução.

Com base no exposto, procurou-se, neste trabalho, estender a outros antibióticos aminoglicosídicos, em diversas formas farmacêuticas, a referida adaptação.

Simultaneamente, procedeu-se à análise da potência antibacteriana das amostras, pela determinação da atividade percentual, através do método microbiológico dos cilindros em placas⁸.

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

** 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.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As concentrações das soluções dos padrões e das amostras dos antibióticos em estudo estão expressas em quantidade da base pura por volume, nos casos da amicacina, canamicina e sisomicina, e em quantidade do sulfato por volume, nos casos da estreptomina e neomicina.

2.1. Amostras

vel), canamicina (solução injetável), estreptomina (pó para injetável) e sisomicina (solução injetável). Fez-se uso, também, de pomada de neomicina, preparada por BAPTISTA⁴, segundo a seguinte composição: sulfato de neomicina 0,05g; polietilenoglicol 4000, 4,14g e polietilenoglicol 400, 5,81 g. Destas amostras foram preparadas soluções aquosas na concentração de 1,5 mg/ml.

2.2. Padrões

Foram utilizadas soluções aquosas dos padrões dos antibióticos em estudo nas concentrações de 0,75; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg/ml.

2.3. Ensaio

Para cada um dos antibióticos pesquisados, seguiu-se a seguinte técnica: a cada 20ml de solução do padrão e da amostra, foram adicionados 2 ml de solução de sulfato cúprico 5% em ácido sulfúrico 0,01N e 2ml de solução de hidróxido de sódio 2N. Agitou-se e deixou-se em repouso por 5 minutos. O precipitado de hidróxido cúprico foi separado por centrifugação a 4000 rpm, durante 5 minutos, utilizando-se centrifugador Janetski K 23. A densidade óptica do sobrenadante, constituído pelo complexo de cobre do antibiótico aminoglicosídico, de tonalidades variáveis de azul e violeta, dependendo do antibiótico ligante, foi determinada em espectrofotômetro Varian série 634 no comprimento de onda de absorção máxima, pré-estabelecido pelas curvas de absorção. Foram utilizadas cubetas de 1cm e, como

branco, água destilada, ensaiada nas mesmas condições.

2.4. Curvas de Absorção

Foram preparados complexos de cobre, conforme descrito no item 2.3., utilizando-se soluções aquosas dos padrões dos antibióticos na concentração de 2,5 mg/ml. Usando-se espectrofotômetro Varian série 634 acoplado a registrador, cubetas de 1 cm e, como branco, água destilada, submetida ao mesmo processo, foram obtidas as curvas de absorção dos complexos, no intervalo de 400 a 800 nm.

Os comprimentos de onda de absorção máxima, em nanômetros, encontrados para os complexos de cobre dos antibióticos e utilizados para os respectivos ensaios foram: amicacina, 663; canamicina, 640; estreptomina, 673; neomicina, 643 e sisomicina, 553, conforme indica a Fig. 1.

2.5. Curvas Padrão

Os valores das densidades ópticas dos padrões dos antibióticos foram indicados no eixo das ordenadas e as concentrações dos padrões, em mg/ml, no eixo das abscissas. Cada ponto obtido correspondeu à média de três determinações. A equação da reta, para a representação gráfica obtida, foi determinada através do estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados (Fig. 2, Tabelas 1 e 2).

3. RESULTADOS

Os resultados foram obtidos pela interpolação da média das densidades ópticas, relativas a três determinações, na curva padrão.

As Tabelas 3 e 4 mostram os resultados dos ensaios da canamicina e da neomicina, respectivamente.

4. DISCUSSÃO

AGRAWAL *et alii* prepararam complexos de cobre da canamicina² e da estreptomina.

cina^{1,3} e os utilizaram, juntamente com um ligante auxiliar, o tartarato de sódio e potássio, para o doseamento destes antibióticos. O uso do ligante auxiliar deveu-se, segundo os autores, entre outro fatores, à instabilidade dos complexos.

No presente estudo, o complexo de cobre da estreptomicina mostrou-se instável e, igualmente, não se obteve estabilidade nos complexos de cobre da amicacina e da sisomicina, que permitisse o uso dessa reação química como forma de doseamento destes

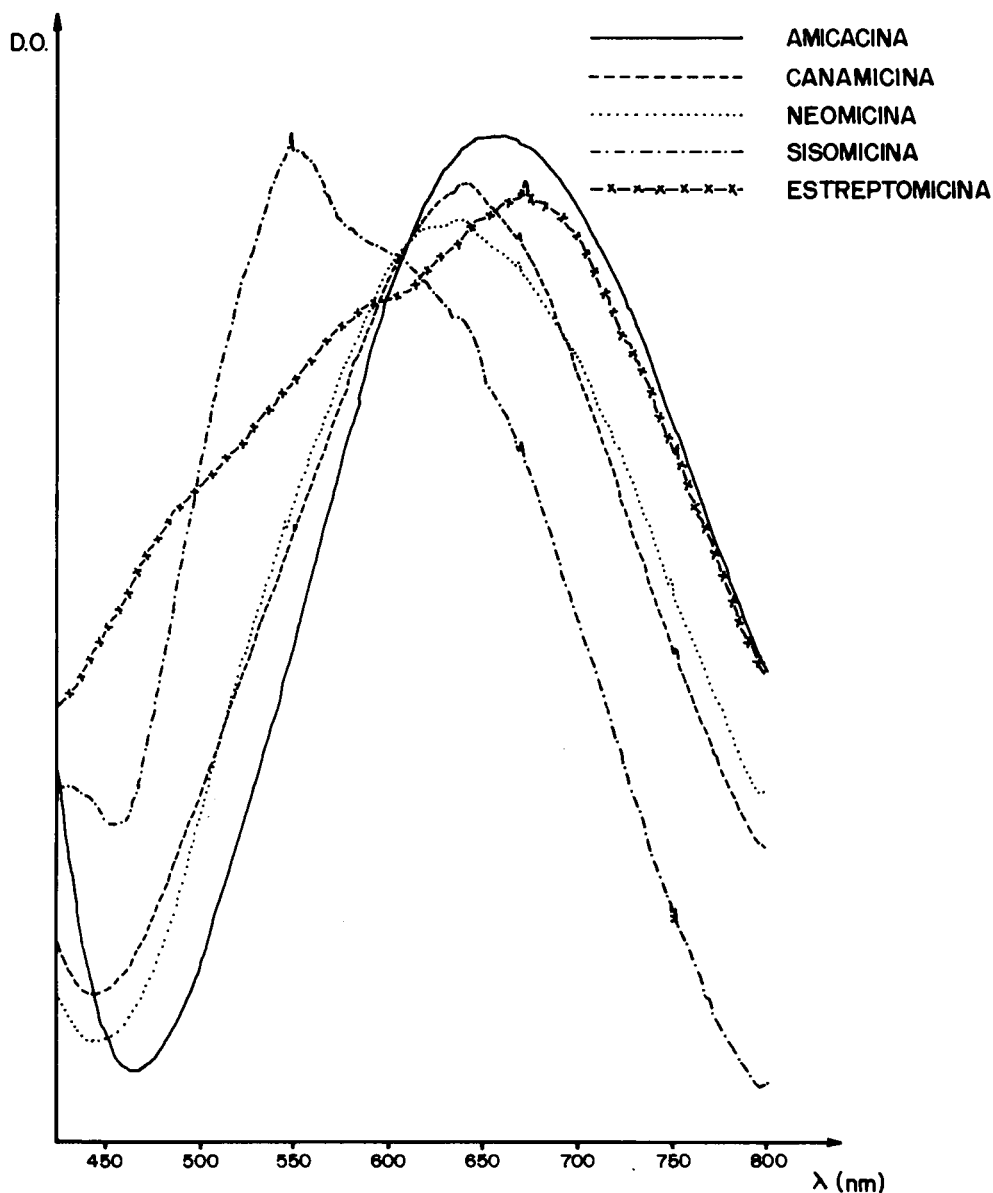


FIG. 1 — Curvas de absorção dos complexos de cobre dos antibióticos aminoglicosídicos.

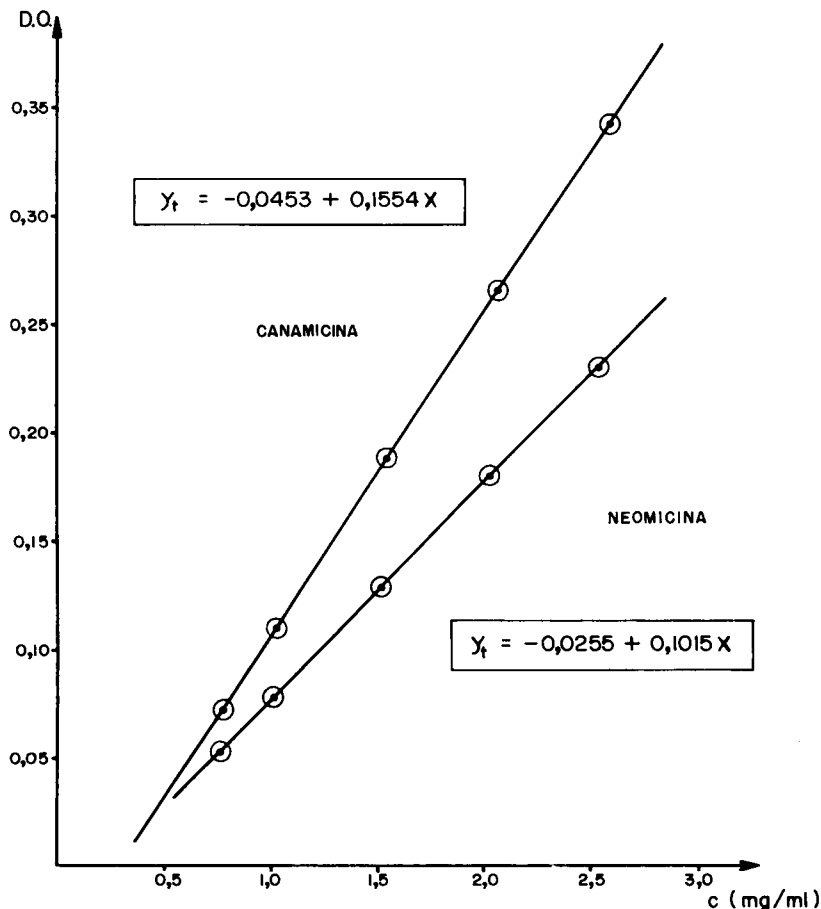


FIG. 2 — Representação gráfica das curvas padrão obtidas para a canamicina e neomicina.

antibióticos. Essa instabilidade traduziu-se, na prática, por turvação da solução do complexo, quando obtida por filtração, segundo a metodologia de CAMPOS⁵. Optou-se, então, pela separação dos complexos do meio reacional por centrifugação, como outros autores já haviam realizado^{1,2,3,6,13}.

Esta providência eliminou a turbidez da solução, mas os resultados obtidos para as densidades ópticas não refletiram as diferentes concentrações desses antibióticos, o que impediu o uso do método para o seu doseamento.

Por outro lado, a canamicina e a neomicina formaram complexos estáveis e obedientes à lei de Beer na faixa de concentração estudada.

Foram utilizadas amostras comerciais dos sulfatos de amicacina (solução injetável). Deve-se frisar que o ensaio de neomicina, segundo o método do sulfato de cobre, foi reprodutível, apesar da defasagem observada entre os valores obtidos por este método e os do método microbiológico. Este fato está de acordo com as pesquisas de BAPTISTA⁴, que observou um decréscimo da concentração percentual do princípio ativo maior que

o decréscimo da atividade percentual, quando o antibiótico foi submetido à degradação térmica acelerada e doseado pelos métodos do sulfato de cobre e dos cilindros em placas. Os resultados iniciais, quando a preparação farmacêutica era ainda recente, foram compatíveis pelos dois métodos.

5. CONCLUSÕES

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

1 — O método espectrofotométrico do sulfato de cobre pode ser utilizado para o doseamento do sulfato de canamicina, matéria-prima ou solução injetável;

2 — O método espectrofotométrico do sulfato de cobre não deve ser aplicado ao doseamento do sulfato de neomicina em preparações farmacêuticas não recentes;

3 — A determinação de concentração percentual de canamicina e de neomicina pelo método espectrofotométrico do sulfato de cobre deve ser sempre comparada à avaliação da potência antibacteriana, pelo método microbiológico dos cilindros em placas, e

4 — Existe a possibilidade da aplicação deste método espectrofotométrico para o doseamento de outros antibióticos aminoglicosídicos.

TABELA 1 — —Canamicina: análise estatística dos dados. Cálculo da linha de regressão e determinação da equação da reta.

x	y	(x- \bar{x})	(x- \bar{x})y	(x- \bar{x}) ²	\bar{x}_0	\bar{y}_t
0,75	0,071	-0,80	-0,0568	0,6400	0,069	0,071
0,75	0,073	-0,80	-0,0584	0,6400		
0,75	0,062	-0,80	-0,0496	0,6400		
1,00	0,109	-0,55	-0,0600	0,3025	0,108	0,110
1,00	0,114	-0,55	-0,0627	0,3025		
1,00	0,102	-0,55	-0,0561	0,3025		
1,50	0,182	-0,05	-0,0091	0,0025	0,186	0,188
1,50	0,187	-0,05	-0,0094	0,0025		
1,50	0,190	-0,05	-0,0095	0,0025		
2,00	0,262	0,45	0,1179	0,2025	0,270	0,266
2,00	0,283	0,45	0,1274	0,2025		
2,00	0,265	0,45	0,1193	0,2025		
2,50	0,348	0,95	0,3306	0,9025	0,345	0,343
2,50	0,337	0,95	0,3202	0,9025		
2,50	0,349	0,95	0,3316	0,9025		
23,25	2,934	0	0,9554	6,1500		

\bar{y}_t valores médios calculados, teoricamente, para as densidades ópticas.

$$y_t = a + b(x - \bar{x})$$

$$\bar{x} = 1,55$$

$$a = \bar{y} = 0,1956$$

$$b = \frac{(x - \bar{x})y}{(x - \bar{x})^2} = 1,554$$

Substituindo, tem-se a equação da reta:

$$y_t = -0,453 + 0,1554x$$

TABELA 2 — Neomicina: análise estatística dos dados. Cálculo da linha de regressão e determinação da equação da reta.

x	y	(x- \bar{x})	(x- \bar{x}) y	(x- \bar{x}) ²	\bar{y}_0	\bar{y}_1
0,75	0,057	-0,80	-0,4560	0,6400		
0,75	0,058	-0,80	-0,0464	0,6400	0,054	0,051
0,75	0,047	-0,80	-0,3760	0,6400		
1,00	0,076	-0,55	-0,0418	0,3025		
1,00	0,080	-0,55	-0,0440	0,3025	0,075	0,076
1,00	0,069	-0,55	-0,0380	0,3025		
1,50	0,126	-0,05	-0,0063	0,0025		
1,50	0,124	-0,05	-0,0062	0,0025	0,126	0,127
1,50	0,129	-0,05	-0,0065	0,0025		
2,00	0,166	0,45	0,0747	0,2025		
2,00	0,171	0,45	0,0770	0,2025	0,171	0,178
2,00	0,177	0,45	0,0797	0,2025		
2,50	0,242	0,95	0,2299	0,9025		
2,50	0,220	0,95	0,2090	0,9025	0,233	0,228
2,50	0,238	0,95	0,2261	0,9025		
23,25	0,1980	0	0,6240	6,1500		

\bar{y}_1 = valores médios calculados, teoricamente, para as densidades ópticas.

$y_1 = a + b(x - \bar{x})$

$\bar{x} = 1,55$

$a = \bar{y} = 0,1318$

$b = \frac{(x - \bar{x})_y}{(x - \bar{x})^2} = 0,1015$

Substituindo, tem-se a equação da reta:

$y_1 = -0,0255 + 0,1015x$

TABELA 3 — Canamicina: valores obtidos para a atividade percentual (método microbiológico) e para a concentração percentual (método espectrofotométrico do sulfato de cobre).

Atividade (%) ⁺	Concentração (%) ⁺⁺
104,84	108,67
113,01	106,67
116,07	103,67
117,86	104,00
119,65	102,00
115,15	
$\bar{x} = 114,43$	$\bar{x} = 105,00$

+ Cada valor corresponde à média de duas determinações.

++ Cada valor corresponde à média de três determinações.

TABELA 4 — Neomicina: valores obtidos para a atividade percentual (método microbiológico) e para a concentração percentual (método espectrofotométrico do sulfato de cobre).

Atividade (%) ⁺	Concentração (%) ⁺⁺
82,66	73,33
85,56	68,67
84,40	67,33
86,81	68,00
85,42	67,33
$\bar{x} = 84,97$	$\bar{x} = 68,93$

+ Cada valor corresponde à média de duas determinações.

++ Cada valor corresponde à média de três determinações.

EVANGELISTA, R. C. & SCHAPOVAL, E. E. S. — Contribution to the quantitative determination of aminoglycosidic antibiotics in pharmaceutical preparations. II. Copper sulfate spectrophotometric assay method. *Rev. Ciênc. farm.*, São Paulo, 5:21-27, 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 is based on the formation of colored complexes between aminoglycosidic antibiotics and copper (II) ion. The optical densities of copper complex solutions of antibiotics samples were interpolated on a standard curve constituted by the optical densities of copper complex solutions of antibiotics standards and their respective concentrations. Paralelly, the percentual activity of the samples were determined by means of microbiological assay method, in order to compare the results. Good results were obtained in kanamycin and neomycin assays.*

KEY-WORDS: *Aminoglycosidic antibiotics; copper sulfate spectrophotometric, assay method.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRAWAL, J. K. & VIJAYVARGIYA, R. — Acid dissociation constant of streptomycin perchlorate and stability constant of its complex with copper (II). *J. Indian chem. Soc.*, 52:190-2, 1975.
2. AGRAWAL, J. K. *et alii* — Spectrophotometric studies of kanamycin-copper complex and determination of kanamycin sulfate using an auxiliary ligand. *J. inorg. nucl. Chem.*, 40:1715-8, 1978.
3. AGRAWAL, J.K. *et alii* — Spectrophotometric studies of copper-streptomycin complex and determination of streptomycin sulphate using an auxiliary ligand. *J. Indian Inst. Sci.*, 60:9-14, 1978.
4. BAPTISTA, E. R. — *Contribuição ao estudo do antibiótico neomicina na forma farmacêutica pomada*. Porto Alegre, Faculdade de Farmácia, UFRGS, 1980. (Dissertação — Mestrado).
5. 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).
6. CANTI, G. *et alii* — Complexes between pilocarpine and cobalt (II), nickel (II), copper (II), and zinc (II) ions. *J. pharm. Sci.*, 69:1220-2, 1980.
7. EUROPEAN Pharmacopeia. — Paris, Maisonneuve, 1971. v. 2, p. 49-52, 364-7.
8. 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.
9. HANNESSIAN, S. & PATIL, G. — Aminoglycoside antibiotics — a method for selective N-acylation based on the temporary protection of amino alcohol functions as copper chelates. *Tetrahedron Lett*, 12:1035-8, 1978.
10. JOB, P. — Recherches sur la formation de complexes minéraux en solution, et sur leur stabilité. *Ann. Chim.*, 9:113-203, 1928.
11. KARTSEVA, V.D. *et alii* — Colorimetric method for determination of gentamicin. *Aantibiotiki*, 22:974-7, 1977.
12. LI, N. & DOODY, E. — Polarographic potentiometric and conductometric studies on the aspartate and alinate complexes of copper. *J. Am. chem. Soc.*, 72:1891-4, 1950.
13. OSMAN, A. & ABU-EITTAH, R. — Complex formation between copper (II) and thiobarbiturates. *J. pharm. Sci.*, 69:1164-8, 1980.
14. PHARMACOPÉE française. 9. ed. Paris, Maisonneuve, 1972. p. 581-4.
15. YAMABE, S. — A further study of Cu⁺⁺ chelate of kanamycin. *Jap. J. Pharmacol.*, 17:120-3, 1967.