

## CONTRIBUIÇÃO AO DOSEAMENTO DE ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDICOS EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS. IV. MÉTODO FLUORIMÉTRICO DO 7-CLORO-4-NITROBENZO-2-OXA- -1,3-DIAZOL (CLORETO DE NBD)\*

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 fluorimétrico 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 compostos altamente fluorescentes derivados da reação de amins primárias e secundárias com o 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (cloreto de NBD). Não foram obtidos resultados satisfatórios, porque não foi possível a construção de curvas de calibração com as características necessárias, embora os antibióticos aminoglicosídicos estudados apresentem, teoricamente, condições de formarem compostos fluorescentes na reação com o cloreto de NBD.*

*UNITERMOS: Antibióticos aminoglicosídicos, doseamento; método fluorimétrico; cloreto de NBD.*

---

### 1. INTRODUÇÃO

O 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (cloreto de NBD) é um reagente fluorigênico bastante estável e específico para grupos amino.

A formação de compostos altamente fluorescentes, derivados da reação de amins primárias e secundárias com o cloreto de NBD, primeiramente estudada por GHOSH & WHITEHOUSE<sup>5</sup>, fundamenta-se no deslocamento do cloro do C-7 pelo grupo amino, com produção de ácido clorídrico.

Todos os antibióticos aminoglicosídicos mostram condições estruturais para apresentar tal reação. Analogamente aos estudos de VAN HOOF & HEYNDRIKX<sup>10</sup>, em anfe-

taminas, e aos de LAWRENCE & FREI<sup>7</sup>, em carbamatos, a reação com o cloreto de NBD envolveria os grupos amino dos antibióticos aminoglicosídicos.

CAMPOS<sup>2</sup> obteve bons resultados para o doseamento fluorimétrico da gentamicina (matéria-prima e em formas farmacêuticas), através de sua adaptação ao método de KABASAKALIAN *et alii*<sup>6</sup>.

Neste trabalho, procurou-se estender a referida adaptação, visando o seu doseamento em diversas preparações farmacêuticas, uma vez que existem poucos métodos físico-químicos oficiais<sup>3,9</sup> de doseamento de antibióticos desse grupo.

---

\* 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.

Paralelamente, efetuou-se a avaliação da atividade percentual das amostras, através de método microbiológico de cilindros em placas <sup>4</sup>, para comparação dos resultados.

## 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

Foram utilizadas amostras comerciais dos sulfatos de amicacina (solução injetável), canamicina (solução injetável), estreptomina (pó para injetável) e sisomicina (solução injetável). Fez-se uso, também, de pomada de neomicina, preparada por BAPTISTA <sup>1</sup>, segundo a seguinte composição: sulfato de neomicina 0,05 g; polietilenoglicol 4000 4,14 g e polietilenoglicol 400 5,81 g. Destas amostras foram preparadas soluções aquosas na concentração de 40 mg/ml.

### 2.2. Padrões

Foram utilizadas soluções aquosas dos padrões dos antibióticos em estudo na concentração de 40 mg/ml.

### 2.3. Placas Suporte

Foram utilizadas placas de vidro, de 20 cm de lado, cobertas com uma camada de sílica gel G 60 de 250  $\mu$  de espessura.

### 2.4. Revelador

Foi preparada uma solução de cloreto de NBD em metanol 99,5% p.a., na concentração de 0,25 mg/ml, conservando-se em refrigerador.

### 2.5. Ensaio

Amostra e padrão foram aplicados, por meio de seringa Hamilton, nas placas de sílica

ca gel. Para cada determinação, o padrão foi aplicado em volumes de 0,5, 1,5 e 2,5  $\mu$ l, correspondentes a 20, 60 e 100  $\mu$ g do antibiótico aminoglicosídico na forma da base livre ou de sulfato, e a amostra, em triplicata, em volumes de 1,5  $\mu$ l, ou seja, teoricamente, 60  $\mu$ g do antibiótico em base livre ou sulfato. Cada placa permitiu obter seis determinações, através de seis séries de aplicações. Em seguida, a placa foi seca a 120°C, por 10 minutos, resfriada, nebulizada, do modo mais uniforme possível, com o revelador, seca novamente a 120°C por 10 minutos, deixada resfriar e observada sob luz ultra-violeta. As manchas, de coloração amarelada no visível e com fluorescência verde ao ultra-violeta, foram raspadas para tubos de ensaio secos, agitadas com 5 ml de etanol absoluto p.a. e duas gotas de ácido clorídrico fumegante p.a. As suspensões foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, em centrifugador Excelsa 2 - Fanem modelo 205 N. Os sobrenadantes foram transferidos, quantitativamente, para balões bolumétricos de 25 ml, e os resíduos lavados novamente com 5 ml de etanol absoluto p.a. e duas gotas de ácido clorídrico fumegante p.a. Após nova centrifugação, nas mesmas condições, os sobrenadantes foram colocados nos respectivos balões volumétricos, completando-se o volume com etanol absoluto p.a. Utilizou-se, como branco, o sobrenadante obtido da raspagem da sílica de fundo, eluída e trabalhada nas mesmas condições do padrão e da amostra. A porcentagem de fluorescência transmitida pelas soluções foi determinada em fotofluorômetro Coleman modelo 12C, utilizando-se cubetas Perkin-Elmer de 19 x 105mm e os filtros primário e secundário pré-selecionados para cada caso. O padrão mais concentrado foi ajustado para 80% de transmissão de fluorescência, seguindo-se as leituras das outras soluções, dos padrões, das amostras e do branco. Subtraiu-se, de todas as leituras obtidas, o valor encontrado para o branco correspondente.

### 2.6. Seleção do Par de Filtros Apropriados

Preparou-se uma série de soluções aquosas do padrão do antibiótico em ensaio,

nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg/ml. Colocaram-se no aparelho um filtro primário e um filtro secundário, e ajustou-se em 100% a leitura da transmissão de fluorescência do padrão mais concentrado. Mediram-se as leituras das outras soluções, incluindo a de um branco. Plotaram-se os resultados numa curva de calibração. Removeu-se o filtro primário e colocou-se outro. Sem qualquer alteração no aparelho, repetiram-se as operações de medição da transmissão de fluorescência de todas as soluções da série mais o branco. Plotaram-se os resultados. Repetiu-se a operação com todos os filtros primários que acompanhavam o fotofluorômetro. Dos resultados obtidos, selecionou-se o filtro primário que produziu a máxima inclinação da curva e a menor leitura para o branco. Substituiu-se o filtro secundário por outro, repetiram-se as operações e plotaram-se os resultados. Todos os filtros secundários que acompanhavam o aparelho foram usados. O conjunto de filtros adequado foi selecionado com base na linearidade e inclinação da curva de calibração e na fluorescência mínima do branco.

### 3. RESULTADOS

Para o cálculo da concentração percentual de amicacina, canamicina, estreptomocina, neomicina ou sisomicina, elaborou-se, a cada determinação, uma curva com os três valores relativos aos padrões, colocando-se a porcentagem de fluorescência transmitida no eixo das ordenadas e a quantidade de antibiótico aminoglicosídico, em  $\mu\text{g}$ , no eixo das abcissas. Interpolou-se na curva padrão a média dos três valores encontrados para a amostra, determinando-se, deste modo, a quantidade percentual de antibiótico em cada amostra.

Não foram obtidos resultados satisfatórios com nenhum dos antibióticos estudados, porque não foram obtidas curvas de calibração com as características necessárias e, especialmente, todas as leituras dos brancos, em todos os ensaios, mostraram valores muito altos, em relação às leituras dos padrões e das amostras.

### 4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, a falta de informações sobre os espectros de excitação e de emissão dos complexos fluorescentes dos antibióticos em estudo orientou a metodologia à seleção, por tentativas, dos filtros primário e secundário adequados para cada caso.

Esgotando-se todas as combinações possíveis entre os filtros disponíveis, verificou-se que nenhum conjunto de filtros era adequado para o ensaio, pois não foi possível obter-se curvas de calibração com inclinação e linearidade adequadas, nem leituras baixas dos brancos.

Pensando-se na possibilidade de alteração do reagente, testou-se uma amostra de gentamicina e foram obtidos resultados satisfatórios, coerentes com as pesquisas de CAMPOS<sup>2</sup>.

Naturalmente, há que se pesquisar modificações na técnica, para cada caso específico, uma vez que é sabido que diversos fatores têm influência no fenômeno da fluorescência.

Assim, o aumento da temperatura e a diminuição da viscosidade do solvente, por exemplo, causam uma queda da eficiência quântica da maioria das espécies fluorescentes.<sup>8</sup>

Além disso, o pH deve ser o mais conveniente para o desenvolvimento do sistema fluorescente, pois numa estreita faixa de pH observa-se variação no comportamento fluorescente das substâncias. Uma simples modificação estrutural, como a adição ou perda de um próton, causada por uma variação do pH, pode diminuir, ou até destruir, a fluorescência<sup>8</sup>.

No presente trabalho, não se pensou em introduzir modificações no método original, uma vez que o objetivo era testar a técnica adaptada por CAMPOS<sup>2</sup> para o método de KABASAKALIAN *et alii*<sup>6</sup> nos antibióticos estudados.

As únicas modificações efetuadas relacionavam-se a propriedades inerentes a cada um dos antibióticos ensaiados, como,

por exemplo, seus espectros de excitação e de emissão de fluorescência, traduzidos, na prática, pelo par de filtros específicos.

## 5. CONCLUSÕES

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

1 — Não é possível o doseamento dos antibióticos aminoglicosídicos amicacina, canamicina, estreptomycin, neomicina e si-

somicina, matérias-primas ou em preparações farmacêuticas, pelo método da CAMPOS<sup>2</sup>, adaptado de KABASAKALIAN *et alii*<sup>6</sup>;

2 — Podem ser experimentadas modificações no referido método, para possibilitar sua utilização no doseamento dos antibióticos estudados; e

3 — Existe a possibilidade da utilização do método fluorimétrico com o cloreto de NBD para o doseamento de outros antibióticos aminoglicosídicos.

---

EVANGELISTA, R. C. & SCHAPOVAL, E. E. S. — Contribution to the quantitative determination of aminoglycosidic antibiotics in pharmaceutical preparations. IV. 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD chloride) fluorimetric method. *Rev. Ciênc. farm.*, São Paulo, 5:35-38, 1983.

**ABSTRACT:** The authors tested an adaptation of a gentamicin fluorimetric 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 solutions, powder for injection, and ointment). The method is based on the formation of highly fluorescent compounds derived from the reaction between primary or secondary amines and 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD chloride). Satisfactory results were not obtained, because it was impossible to draw calibration curves with the necessary characteristics, although the aminoglycosidic antibiotics studied show, theoretically, conditions to form fluorescent compounds in the reaction with NBD chloride.

**KEY-WORDS:** Aminoglycosidic antibiotics; fluorimetric method; NBD chloride.

---

## 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.*, 5:17-20, 1983.
5. GHOSH, P. B. & WHITEHOUSE, M. W. — 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole; a new fluorigenic for amino acids and other amines. *Biochem. J.*, 108:155-6, 1969.
6. KABASAKALIAN, P. *et alii* — Determination of gentamicin complex components in fermentation broth by "in situ" fluorimetric measurements of 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole derivatives. *Anal. Chem.*, 49:953-5, 1977.
7. LAWRENCE, J. F. & FREI, R. W. — Fluorogenic labeling of N-methyl and N, N-dimethylcarbamates with 4-chloro-7-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole. *Anal. Chem.*, 44:2046-9, 1972.
8. OHLWEILER, O. A. — *Química analítica quantitativa*. 2.ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1976. p. 99-100, 748-55.
9. PHARMACOPÉE française — 9.ed. Paris, Maisonneuve, 1972. p.581-4.
10. VAN HOOF, F. & HEYNDRIKX, A. — Thin-layer-chromatographic-spectrophotofluorometric analysis of amphetamine and amphetamine analogs after reaction with 4-chloro-7-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole. *Anal. Chem.*, 46:286-8, 1974.