

ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE GENTAMICINA COMERCIALIZADA NAS FARMÁCIAS DE CURITIBA-PR

CONCENTRATION ANALYSIS OF COMMERCIALIZED GENTAMICIN FROM PHARMACIES OF CURITIBA - PR

ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE GENTAMICINA

Eduardo Vinícius Silva Almeida¹

Ricardo Wagner²

RESUMO

A gentamicina, um fármaco aminoglicosídeo, desde 1963 auxilia o tratamento de pacientes com infecções bacterianas gram-negativas. Mesmo hoje em dia, seu uso faz-se presente devido à seu baixo custo quando comparado a fármacos de mesma eficácia contra agentes bacterianos resistente. Pela sua alta toxicidade, muitos pacientes tratados com gentamicina acabam desenvolvendo reações adversas, algumas irreversíveis. Para evitar este problema faz-se necessário um controle rigoroso da dose administrada aos pacientes. Por esta razão, testes de controle de qualidade são essenciais para a garantia da dose administrada. Neste trabalho, foram analisadas concentrações de gentamicina presentes em sete ampolas injetáveis, sendo elas medicamentos similares e de referência comercializadas em farmácias da cidade de Curitiba – PR. A metodologia utilizada foi um ensaio desenvolvido e validado por Frutos *et al* (1999) baseado na reação da ninhidrina com aminas primárias e secundárias presentes na molécula de gentamicina, gerando um complexo colorimétrico capaz de ser analisado em espectrofotômetro. Foram utilizados os valores da Consulta Pública nº 24 de 23 de março de 2010 e da Farmacopéia dos Estados Unidos para a comparação dos resultados obtidos. Das amostras analisadas, uma extrapolou o limite máximo permitido descrito na literatura, demonstrando que existem falhas no controle da produção.

Descritores: sulfato de gentamicina; concentração; espectrofotometria; ninhidrina.

1. Aluno do curso de Farmácia da Unibrasil. e-mail: duh.almeida@hotmail.com
2. Professor do curso de Farmácia da Unibrasil e orientador do TCC

ABSTRACT

The gentamicin, an aminoglycosides medicine, since 1963 helps patients during treatment of bacterial infections gram-negatives. Even nowadays, gentamycin is currently used due to its low cost when compared to other medicines with the same efficacy against resistant bacterial agents. Because of its high toxicity, a high number of patients treated with gentamycin develop various types of adverse reaction, some of them irreversible. In order to avoid this problem, there is a need for strict control of the dose prescribed. In this work, it was analyzed the gentamicin concentration present in seven injectable ampoules, all of them being similar and referenced medicines commercialized in drugstores in Curitiba - Paraná. The methodology used was a practice developed and validated by Frutos et al (1999) based in the ninhydrin reaction with primary and secondary amines existing at the gentamicin molecule, generating a colorimetric complex able to be analyzed in a spectrophotometer. It was used values from the Public Consultation No. 24, March 23, 2010 and the United States Pharmacopeia for comparison of results. From the analyzed samples, one of them extrapolated the allowed maximum limit described in the literature, demonstrating that there are failures in the production control.

KEY WORDS: gentamicin sulfate; concentration; spectrophotometry; ninhydrin

INTRODUÇÃO

Os antibióticos aminoglicosídeos foram descobertos em 1943 por Selman Abraham Waksman. Com a determinação estrutural da estreptomicina, abriu-se um novo grupo de fármacos, vindo a revolucionar o tratamento contra algumas bactérias que, até então, não possuíam um tratamento satisfatório. Um exemplo da importância desta descoberta é o tratamento frente ao bacilo *Mycobacterium tuberculosis* causador da tuberculose, doença que atinge a população desde antes de Cristo^(1,2).

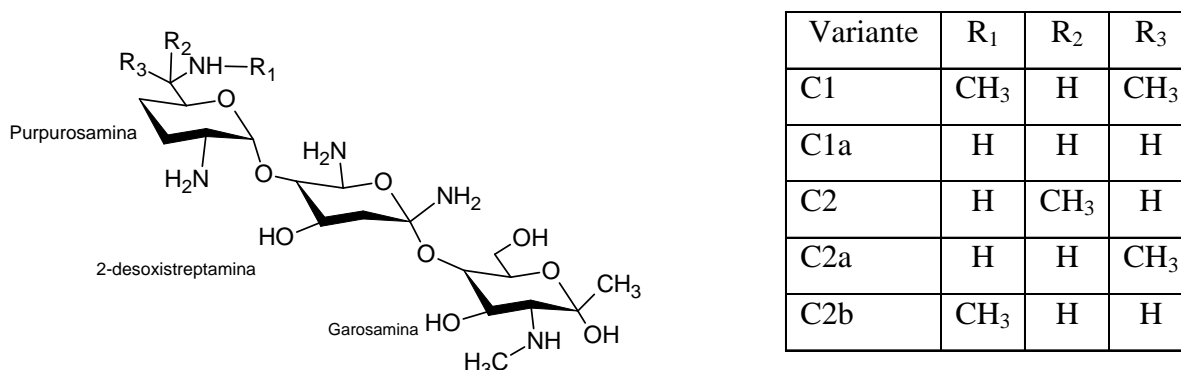
O nome aminoglicosídeos deriva do fato da sua molécula ser basicamente constituído por açúcares aaminados. Por possuírem grupamentos aaminas tem seu pKa elevado (superior a 9), encontrando-se ionizada em meio fisiológico, tendo alta solubilidade em solventes polares.

Sua permeabilidade através da membrana externa bacteriana ocorre através das aquaporinas presentes na membrana externa da bactéria. Já sobre a membrana interna

acredita-se que ocorre em duas etapas. A primeira denominada fase dependente de energia (F1DE), utiliza do potencial da membrana celular para adentrar no interior da bactéria, sendo este o motivo de sua baixa ação em bactérias anaeróbicas. Após penetração, os antibióticos aminoglicosídeos, tendem a se ligar com maior frequência na porção 30S do ribossomo, porém, em menor quantidade também podem exercer ligações na porção 50S. Com estas ações podem promover a interrupção da síntese proteica bacteriana ou a produção de moléculas incompletas (falhas), este processo, não muito compreendido ainda, conhecido como fase dependente de energia II (F2DE), acredita-se que pode fazer com que algumas dessas moléculas falhas venham a se inserir na membrana citoplasmática, aumentando assim, a difusão do fármaco ao interior da bactéria ^(1,2,3,4).

Em 1963, extraída da bactéria *Micromonospora purpurea* por Marvin J. Weinstein, a gentamicina viria a ser um dos fármacos mais utilizados desta classe. Possuindo cinco formas estruturais denominadas C1, C1_a, C2, C2_a e C2_b sendo as mais encontradas a C1, C1_a e C2, tem sua modificação estrutural ocorrente na porção da purpurosamina nos radicais R1, R2 e R3 (Figura 1). Tem baixa permeabilidade pela membrana gastrointestinal, quando administradas pelas vias oral ou retal, menos de 1% do fármaco é absorvido pelas mucosas, sendo o restante excretado de forma inalterada nas fezes. Em caso de doenças gastrointestinais esta absorção pode ser ampliada de acordo com o tamanho da lesão. A absorção da gentamicina é rápida, tendo sua concentração máxima atingida de 30 a 90 minutos quando administrada por via intramuscular. Devido sua alta polaridade não penetram no sistema nervoso central, olhos e na maioria das células, sendo em alguns casos necessária a administração local ou a interação com outros fármacos para a obtenção de um tratamento satisfatório, sua forma de excreção é quase que totalmente a filtração glomerular, podendo se encontrar vestígios de gentamicina presentes na urina após 20 dias do término do tratamento ^(1,2,3).

Figura 1: Molécula de gentamicina



A utilização deste antibiótico em grandes concentrações por um período elevado de tempo, pode causar sérios problemas de toxicidade. Os mais importantes são a ototoxicidade e a nefrotoxicidade, e mais raramente, o bloqueio neuromuscular. A ototoxicidade tem como princípio a reação provocada pela gentamicina ao VIII par de nervos cranianos, podendo levar o paciente a lesões nas células pilosas sensoriais e no labirinto vestibular, estas lesões podem causar surdez e descontrole do equilíbrio. A nefrotoxicidade tem como consequência a insuficiência renal aguda. Há estudos em animais provando que vários fatores de riscos podem facilitar a lesão como: sexo masculino, depleção de sódio, lesão hepática e doses múltiplas do fármaco. Sua atuação no rim se deve à ligação do fármaco com o túbulo proximal. Acredita-se na possibilidade de receptores nestas células, causadores da endocitose do antibiótico. O bloqueio neuromuscular consiste na inibição pré-juncional de acetilcolina, sendo possível o tratamento com sais de cálcio. Este bloqueio encontra-se mais frequentemente em pacientes portadores de *miastenia gravis* e o uso associado do fármaco com fármacos anestésicos e outros bloqueadores musculares. Estes efeitos são frequentemente encontrados também em animais tratados com gentamicina ^(1,2,3,4,5,6,7,8).

Mesmo com tantos riscos de toxidades causadas por esta classe de antibióticos, seu uso se faz importante pelo seu amplo espectro frente a bactérias gram-negativas aeróbicas e baixo custo em relação a outras classes de antibióticos de equivalente eficácia. A fim de evitar efeitos tóxicos foram desenvolvidas técnicas de administrações como a associação de menores concentrações da droga com outros fármacos antibióticos e as doses únicas diárias. Doses únicas com uma concentração total da posologia diária, ao contrário do imaginado, favorece a excreção do fármaco, pois este antibiótico é melhor eliminado tanto da perilinfa e endolinfa da orelha interna, quanto do córtex renal, quando os níveis plasmáticos estão baixos, diminuindo assim, os principais efeitos tóxicos ^(1,3,4).

Uma maneira de prevenir essas reações durante o tratamento, é o controle da concentração do fármaco, evitando uma superdosagem desnecessária ao organismo do paciente.

Para este controle as empresas podem utilizar inúmeras técnicas de doseamento como, por exemplo, uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Mas técnicas colorimétricas também podem ser utilizadas. Desta maneira, este trabalho teve o intuito de

avaliar a concentração de gentamicina em formas farmacêuticas injetáveis encontradas nas farmácias de Curitiba-PR através da técnica espectrofotométrica.

METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no laboratório de Química, nas dependências das Faculdades Integradas do Brasil – UNIBRASIL. Foram analisadas as concentrações de sete amostras de gentamicina (sulfato de gentamicina), adquiridas em farmácias localizadas na cidade de Curitiba-PR, através de recursos próprios, sendo estas amostras, em forma farmacêutica de ampolas do medicamento de referência e similares.

O ensaio realizado para a análise da concentração foi desenvolvido e validado por Frutos *et al* (1999), com base na reação da ninhidrina com aminas primárias e secundárias, gerando um complexo colorimétrico otimizado, denominado Púrpura de Ruhemann, capaz de ser analisado em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 400nm⁽⁹⁾.

Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo todos executados ao mesmo dia e sobre as mesmas condições, a fim de conferir maior credibilidade aos resultados encontrados nas amostras.

Preparo dos reagentes:

Solução tampão fosfato monobásico 0,2M pH 7,4.

Em um balão volumétrico de 250 mL, adicionou-se 62,5 mL de fosfato monobásico de potássio 0,2M, 48,9 mL de hidróxido de sódio 0,2M, acrescentou-se água destilada suficiente para 250 mL, homogeneizou-se e foi realizado a aferição e correção do pH para 7,4.

Solução ninhidrina 1,25%.

Pesou-se 1,25g de ninhidrina, solubilizou-se em água destilada e transferiu-se à um balão volumétrico de 100mL, acrescentou-se água destilada suficiente para 100 mL.

Solução padrão de gentamicina 1mg/mL

Pesou-se 170mg sulfato de gentamicina (correspondente a 100mg de gentamicina), solubilizou-se em solução tampão fosfato 0,2M pH 7,4 e transferiu-se à um balão volumétrico de 100mL, completou-se o volume com tampão fosfato 0,2M pH 7,4.

Curva de calibração

Os tubos de ensaio foram devidamente denominados e adicionou-se os seguintes reagentes para criar uma solução com volume final de 10mL e em diferentes gradientes de concentrações, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Preparo das soluções com diferentes gradientes de concentrações.

Solução padrão gentamicina 1mg/mL	Tampão fosfato 0,2M pH 7,4	Ninhidrina 1,25%
0	8,5 mL	1,5 mL
0,2 mL	8,3 mL	1,5 mL
0,4 mL	8,1 mL	1,5 mL
0,6 mL	7,9 mL	1,5 mL
0,8 mL	7,7 mL	1,5 mL
1 mL	7,5 mL	1,5 mL
1,2 mL	7,3 mL	1,5 mL
1,4 mL	7,1 mL	1,5 mL

Fonte: os autores

Os tubos de ensaio foram vedados com plástico filme para prevenir uma variação na concentração derivada da evaporação da água durante o aquecimento. Levou-se ao banho-maria fervente durante 15 minutos, resfriou-se em banho de gelo e ao abrigo da luz.

Análise das amostras.

Das sete amostras adquiridas, quatro eram medicamento de referência e três marcas similares sendo seis ampolas nas concentrações de 80mg/2mL e uma na concentração de 280mg/2mL. As amostras foram numeradas com o sorteio de três números ao acaso. Por se tratar de uma concentração exacerbada em relação às outras ampolas a amostra 955 sofreu uma prévia diluição antes do ensaio, reduzindo sua concentração inicial de 140mg/mL à 8mg/mL, em seguida foi pipetado 0,05mL da amostra diluída. Este processo teve o intuito de colocá-la dentro do limite de sensibilidade da curva de calibração.

Em vinte e um tubos de ensaio foram adicionados os reagentes e as proporções descritas na tabela 2, sempre realizando três tubos por amostra a fim de criar soluções com volume final de 10mL cuja concentração desejava ser encontrada.

Tabela 2: Preparo das soluções em análise.

Amostra	Quantidade amostra	Quantidade de gentamicina Esperada	Tampão fosfato	Ninhidrina 1,25%
099	0,01mL	0,4mg	8,49mL	1,5mL

109	0,01mL	0,4mg	8,49mL	1,5mL
011	0,01mL	0,4mg	8,49mL	1,5mL
103	0,01mL	0,4mg	8,49mL	1,5mL
008	0,01mL	0,4mg	8,49mL	1,5mL
010	0,01mL	0,4mg	8,49mL	1,5mL
955	0,05mL	0,4mg	8,45mL	1,5mL

Fonte: os autores.

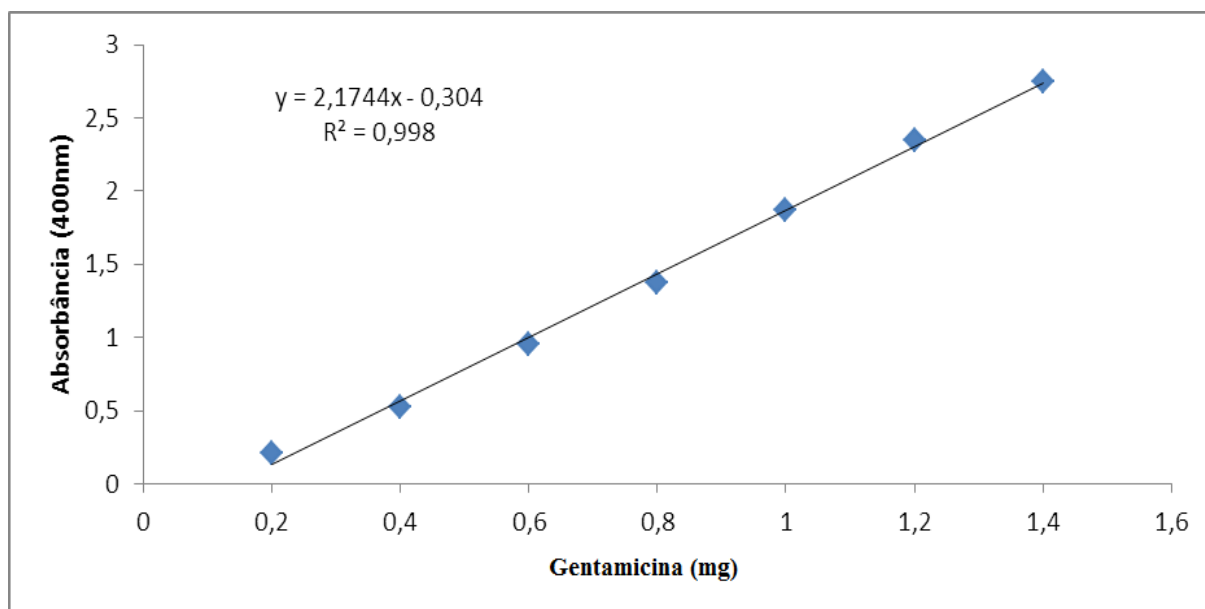
Assim como na confecção da curva, os tubos de ensaio foram tampados com o plástico filme para evitar a evaporação das soluções e a concentração de gentamicina presente nos tubos. Levou-se ao banho-maria à 95°C durante 15 minutos, resfriou-se em banho-de-gelo e ao abrigo da luz.

Logo após o resfriamento das amostras, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro devidamente calibrado e com comprimento de onda de 400nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com a leitura das amostras da tabela 1 foram utilizados para a confecção da curva de calibração sendo o primeiro tubo utilizado como branco tanto na análise dos pontos da curva como nas análises das amostras (Figura 2).

Figura 2: Curva de calibração de gentamicina.



Fonte: os autores.

Devido ao gráfico possuir um r^2 de 0,998, possibilita uma alta proximidade dos pontos com a linha de tendência, dando assim, uma maior confiabilidade na leitura das absorvâncias obtidas pelas amostras.

Na tabela 3, encontram-se os resultados das análises realizadas nas amostras referente a tabela 2, estão presentes a média das três análises por amostra, o desvio padrão entre elas, a concentração esperada, concentração encontrada e o total de gentamicina presente na ampola.

O cálculo realizado para a descoberta da concentração foi:

$$y=b.x+a$$

Onde:

$$a= - 0,304857$$

$$b= 2,174464$$

y= média das absorvâncias

x= concentração da substância

Tabela 3: Resultados encontrados das análises realizadas nas ampolas de sulfato de gentamicina.

Amostra	Media da absorvância	desvio padrão	Quantidade esperada	Quantidade encontrada	Concentração total na ampola
099	0,483	0,0092	0,4mg	0,362mg	72,42mg/ 2mL
109	0,508	0,0236	0,4mg	0,374mg	74,76mg/ 2mL
011	0,552	0,0127	0,4mg	0,394mg	78,84mg/ 2mL
103	0,808	0,0318	0,4mg	0,507mg	102,31mg/ 2mL
008	0,549	0,0170	0,4mg	0,393mg	78,50mg/ 2mL
010	0,555	0,0253	0,4mg	0,395mg	79,06mg/ 2mL
955	0,558	0,0586	0,4mg	0,397mg	278,07mg/ 2mL

Fonte: os autores.

Por não existir parâmetros de variação permitida na Farmacopéia Brasileira foi utilizado como referência para as comparações os parâmetros estipulados na United States Pharmacopeia 32ed. e os valores estipulados na Consulta Pública nº 24, de 23 de março de 2010 que variam entre 90% e 125% da concentração especificada pelo laboratório, permitindo assim, uma variação entre 72mg à 100mg nas ampolas de 80mg/2mL e 252mg à 350mg na ampola com 280mg/2mL^(10,11).

Das sete ampolas analisadas, somente uma apresentou uma concentração irregular segundo os critérios adotados para a verificação dos resultados, sendo esta, a amostra 103,

vindo a apresentar uma concentração de 102,31mg/2mL, ultrapassando o limite máximo de 125% do valor especificado pelo laboratório. Este resultado foi novamente analisado gerando o mesmo valor encontrado anteriormente.

CONCLUSÃO

A metodologia aplicada foi rápida e de fácil execução, mostrando bons resultados e linearidade e confiabilidade. Desta maneira foi possível encontrar divergências maiores que a permitida em relação à concentração presente na ampola e a especificada pelo laboratório. Estas divergências podem vir a aumentar as chances de doses tóxicas aos pacientes e o agravamento do quadro clínico apresentado por ele. A falta da especificação na Farmacopéia Brasileira pode vir a facilitar esta não conformidade na concentração, por ser ela a principal ferramenta reguladora do controle de qualidade de medicamento no Brasil. Acredita-se que mais tarde, o valor estipulado na Consulta Pública 24 de 23 de março de 2010, venha a ser inserido a uma próxima edição da Farmacopéia Brasileira.

REFERÊNCIAS

1. Chambers HF. Antimicrobianos - os aminoglicosídeos. In. Goodman & Gilman -As Bases Farmacológicas da terapêutica. 11^a ed. Rio de Janeiro; Editora Guanabara Koogan; 2006.
2. Rang HP, Dale MM, Agentes antibacterianos – aminoglicosídeos. Farmacologia. 5^a ed. Rio de Janeiro; Editora Guanabara Koogan; 2003.
3. Aquino TJM, Oliveira JAP, Rossato M. Ototoxicidade e otoproteção em orelhas internas de cobaias utilizando gentamicina e amicacina: aspectos ultra-estruturais e funcionais. Rev Bras Otorrinolaringologia. 2008; 74(6):843-52.
4. Block JH; Jr JMB. Antibacterial antibiotics – aminoglycosides. Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 11 ed. Philadelphia; Lippincott Willian& Wilkins 2004.
5. Oliveira JFP, Cipullo JP, Burdmann EA. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. Braz J Cardiovasc Surg 2006; 21(4):444-452.

6. Shor N; Boim MA; Santos OFP. Insuficiência renal aguda - Fisiopatologia, clínica e tratamento. Sarvier, 1ª ed. São Paulo 103-108
7. Almenara FS, Ribeiro L, Matsuno RMS, Lopes RMG, Oliveira TS, Pereira DM. Ototoxicidade do aminoglicosídeo. Rev Cient Eletro de Med Veterinária 2008; 11: 1679-7353
8. Costa DML. Ototoxicidade dos antibióticos aminoglicosídeos e sistema eferente: Comparação entre a administração aguda e crônica com a gentamicina e os efeitos agudos de outros antibióticos. Revista HCPA 1999; 19(2):1983-5485.
9. Frutos P, Torrado S, Lorenzo, Perez-Lorenzo PME, Frutos G. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1999; 21(2000): 1149–1159.
10. United States Pharmacopeia Convention USP XXIX. United States Pharmacopeial Convention. 32 ed. Rockville: Mack Printing; 2008.
11. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Consulta Pública nº 24, de 23 de março de 2010.