

Validação de métodos para a quantificação de antibióticos beta-lactâmicos em medicamentos veterinários por HPLC

Gabriela Coelho Miguel¹ (IC) e Ana Valéria Colnaghi Simionato^{1,2} (PQ)

avsimionato@iqm.unicamp.br

¹Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas - Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Distrito de Barão Geraldo, CEP 13081-970 - Campinas – SP – Brasil.

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica.

Palavras Chave: Antibióticos, Beta-lactâmicos, Validação, HPLC.

Introdução

Medicamentos veterinários se referem a qualquer substância que se aplica ou se administra a um animal¹. Neste grupo estão os antibióticos, substâncias químicas produzidas que destroem ou inibem o crescimento de microorganismos². Antibióticos beta-lactâmicos caracterizam-se por possuírem um anel beta-lactâmico em sua estrutura³ e, neste trabalho, foram estudados os antibióticos amoxicilina (AMO) e ampicilina (AMP).

Os métodos desenvolvidos foram validados de acordo com as especificações da ANVISA⁴, segundo a Resolução nº 899, de 29/05/2003.

Para a avaliação das figuras de mérito, soluções de medicamentos e padrões analíticos foram preparadas diariamente, seguindo metodologias específicas e otimizadas, e analisadas em um cromatógrafo a líquido Shimadzu Proeminence com detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, usando-se uma coluna ACE C18, 150 x 4,6 mm e 3 µm de diâmetro de partícula. As fases móveis (FM) empregadas consistem em uma mistura de uma solução aquosa de ácido fosfórico 5 mmol L⁻¹ pH 2,0 e acetonitrila, em gradiente otimizado, com vazão de 1 mL min⁻¹ e comprimentos de onda de detecção (λ) de 229 nm para AMO e 220 nm para AMP.

Resultados e Discussão

Para a validação, as figuras de mérito avaliadas foram especificidade (seletividade), faixa linear, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

No teste de seletividade, os padrões foram submetidos a condições de estresse, no intuito de forçar suas degradações e verificar se os produtos de degradação coeluiriam com os fármacos, indicando a não seletividade dos métodos. As análises foram realizadas em intervalos de 1h e 24hs após o preparo e indicaram que os métodos são seletivos após 1h, entretanto, após 24hs, estes são seletivos somente em condições oxidantes e sob aquecimento.

Com relação à faixa linear e linearidade, curvas analíticas foram construídas com soluções de padrões de concentração de 10 a 50 µg mL⁻¹. Estas faixas de concentração foram selecionadas de

acordo com a intensidade dos picos. Os gráficos de resíduos indicaram que somente o ponto inicial da AMP deveria ser retirado devido a não linearidade (resíduo>5%).

A precisão foi avaliada nos níveis inter e intradia, com injeções do ponto médio da curva e verificação do coeficiente de variação (CV<5%). A exatidão mediu a concentração de princípio ativo presente nos medicamentos, através da técnica de adição de padrão. A Tabela 1 apresenta os valores obtidos para cada fármaco e respectiva formulação.

Tabela 1. Precisão e exatidão da AMO e AMP.

Formulação	Amoxicilina	Ampicilina	
	Injetável	Injetável	Oral
Precisão	24,4 µg mL ⁻¹ CV = 2,72%	21,7 µg mL ⁻¹ CV = 1,43%	21,2 µg mL ⁻¹ CV = 4,71%
Exatidão	24,3 µg mL ⁻¹ CV = 1,72%	17,5 µg mL ⁻¹ CV = 2,70%	20,8 µg mL ⁻¹ CV = 3,54%

Na robustez, os parâmetros variados para AMP foram proporção inicial da FM, pH da FM aquosa, uso de ultrassom, solução de solubilização, λ , vazão e marca da FM orgânica. O método não foi considerado robusto somente com relação à mudança do λ e na vazão da FM.

Conclusões

Foram validados métodos para a quantificação dos antibióticos AMO sob formulação injetável e AMP, nas formulações injetável e oral. Os 3 medicamentos apresentaram valores distintos dos indicados na bula, com desvios de 4,16 a 21,26%.

Agradecimentos

À Dra Lais Moraes, pelo auxílio durante o desenvolvimento do projeto; ao Ricardo Pereira, técnico do Laboratório de Cromatografia do IQ – UNICAMP; à FAPESP e ao CNPq.

¹Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2003*.

²Samanidou, V. F. e Evaggelopoulou, E. N. *Journal of Separation Science*, **2007**, 30, 2549 – 2569.

³Samanidou, V. F.; Evaggelopoulou, E. N. e Papadoyannis, I. N. *Journal of Separation Science*, **2006**, 29, 1978 - 1908.

⁴Resolução - nº 899 de 29 de maio de 2003. Acessado em 18/01/2012. Disponível em www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.