

Past. 17-615 (04)
5201

ANTÓNIO PROENÇA MÁRIO AUGUSTO DA CUNHA

ANÁLISE DE MISTURAS
DE ESTREPTOMICINA
E DI-HIDRO-ESTREPTOMICINA

(CONTRIBUIÇÃO PARA O SEU ESTUDO)

Publicação subsidiada pela Fundação
CALOUSTE GULBENKIAN



COIMBRA
1 9 6 3

ANÁLISE DE MISTURAS
DE ESTREPTOMICINA
E DI-HIDRO-ESTREPTOMICINA

(CONTRIBUIÇÃO PARA O SEU ESTUDO)

Comp. e Imp.
COIMBRA EDITORA, L.DA
COIMBRA

ANTÓNIO PROENÇA MARIO AUGUSTO DA CUNHA

ANÁLISE DE MISTURAS DE ESTREPTOMICINA E DI-HIDRO-ESTREPTOMICINA

(CONTRIBUIÇÃO PARA O SEU ESTUDO)

Dissertação de candidatura ao grau
de Doutor, apresentada à Faculdade
de Farmácia da Universidade do Porto

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 22/05/2007
Reg. 5101
Cota



posto 17
5101

COIMBRA
1 9 6 3

À MINHA MULHER

A MEUS FILHOS

A MEUS PAIS

À MEUS MESTRES

INTRODUÇÃO

Seguindo a orientação que tem sido dada aos trabalhos de investigação realizados no Centro de Estudos Bio-Galénicos da Escola de Farmácia da Universidade de Coimbra — padronização de métodos analíticos com vista à sua aplicação a especialidades farmacêuticas — pensamos, inicialmente, orientar a nossa dissertação de doutoramento no sentido da análise de antibióticos com interesse terapêutico, produzidos por microorganismos do género Streptomyces.

No decorrer dos anos de 1959 e 1960 ao efectuarmos trabalhos de investigação neste domínio analítico, verificámos que, em face dos inúmeros problemas a resolver, tal finalidade teria de ser conseguida, escalonadamente, para cada grupo de antibióticos afins, pelo que, durante o nosso estágio no Laboratório de Análise Química e Microquímica da Universidade de Genebra, nos dedicámos à dosagem dos antibióticos — Estreptomycina e Di-hidro-estreptomycina.

Deste modo, aproveitando a experiência adquirida no Centro de Polarografia, anexo ao referido Laboratório de Análise Química e Microquímica, pudemos estabelecer métodos de dosagem polarográfica para a estreptomycina e di-hidro-estreptomycina, os quais pos-

suindo uma sensibilidade limite de dosagem comparável à dos métodos microbiológicos, oferecem sobre estes a vantagem de uma maior precisão, rapidez e simplicidade.

Tendo em conta que nem todos os laboratórios estão em condições de possuir um polarógrafo de sensibilidade apropriada a este tipo de dosagem, procurámos na segunda parte do presente trabalho, estudar um método de carácter mais geral, capaz de ser aplicado na análise de especialidades farmacêuticas contendo misturas desses dois antibióticos.

Dentro deste critério, elaborámos um processo de dosagem, em que os antibióticos são separados, numa primeira fase, por cromatografia ou electroforese em papel, e, depois, determinados por técnica microbiológica.

* * *

Antes de terminarmos esta introdução é-nos imensamente grato exprimir todo o nosso reconhecimento a quantos contribuíram, directa

ou indirectamente, para a elaboração deste trabalho. Sentimos, no entanto, o dever de agradecer em particular:

À Fundação Calouste Gulbenkian a bolsa de estudo que nos concedeu durante o nosso estágio na Escola de Química da Universidade de Genebra.

Ao Ex.^{mo} Senhor Prof. Dr. DENNY MONNIER, da Escola de Química da Universidade de Genebra, não só todo o interesse que mostrou ao orientar este trabalho mas também os conselhos e incitamentos que sempre nos dispensou.

Ao Ex.^{mo} Senhor Prof. ANDRÉ MIRIMANOFF, Director da Escola de Farmácia da Universidade de Genebra, a amizade com que nos distinguiu e as facilidades que nos proporcionou.

Aos Ex.^{mos} Senhores Profs. Drs. JOSÉ RAMOS BANDEIRA, ALOÍSIO FERNANDES COSTA e JOSÉ BAETA CARDOSO DO VALE, o interesse que lhes mereceu este trabalho, bem como as facilidades

e as soluções encontradas no sentido de ser assegurada a regência das aulas práticas que nos estavam distribuídas, quando da nossa permanência em Genebra.

Ao Ex.^{mo} Senhor Dr. ANTÓNIO PINHO DE BRÓJO e à Ex.^{ma} Senhora Dr.^a D. MARIA SERPA DOS SANTOS, o auxílio prestado na revisão deste trabalho. Ao primeiro, queremos ainda agradecer as preciosas sugestões que nos deu.

*Aos Laboratórios **Diamant** — França, **Grünenthal** — Alemanha, **Hoecht** — Alemanha, **Merck** — U. S. A., **Novo** — Dinamarca e **Pfizer** — U. S. A., os antibióticos e as especialidades farmacêuticas que puseram à nossa disposição, directamente ou por intermédio dos seus representantes na Suíça.*

Considerações gerais sobre estreptomomicina e di-hidro-estreptomomicina

Em contraste com a descoberta accidental da penicilina, a estreptomomicina resultou de uma longa e persistente pesquisa no sentido da descoberta de antibióticos com actividade sobre bactérias gram-negativas, já que a penicilina se revelou activa essencialmente sobre gérmens gram-positivos.

Nos primeiros anos da I Guerra Mundial o Doutor SELMAN WAKSMAN e seus colaboradores, estudaram muitos microorganismos do solo, em especial os actinomicetes (1), tendo reconhecido que este grupo de gérmens era capaz de produzir grande número de antibióticos (2, 3). Este facto foi, posteriormente, bem comprovado pela série de antibióticos isolados — actinomicina, estreptotricina, clavicina, etc.

No ano de 1944, WAKSMAN e col. (4) conseguiram obter, a partir de culturas de um microorganismo do solo, o *Streptomyces griseus* — classificado, anteriormente, como *Actinomyces* — um concentrado impuro dotado de actividade em relação aos gérmens gram-negativos, ao qual deram o nome de Estreptomomicina. Ao contrário de muitos antibióticos descobertos até então, que apresentavam, quase sempre, uma acção bastante tóxica, a estreptomomicina revelou a par de uma marcada actividade antimicrobiana, uma toxicidade relativamente baixa. Ainda nesse ano, se verificou ser este antibiótico activo sobre muitas bactérias patogénicas, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis*, não só *in vitro* como *in vivo* (5, 6).

Os trabalhos de investigação (7, 8, 9) sobre a estrutura química da estreptomomicina conduziram à síntese da di-hidro-estreptomomicina, anunciada quase simultaneamente por PECK, HOFFHINE e FOLKERS (7) e, BARTZ e col. (8), mediante a hidrogenação catalítica da molécula da estreptomomicina.

A preparação da estreptomomicina está protegida por inúmeras

patentes, incluindo a primeira de WAKSMAN e SHATZ pedida em Fevereiro de 1945 ⁽¹⁰⁾, e explorada comercialmente pela *Merck & Co. Inc.*, em Elkton, Virgínia. A experiência adquirida com a penicilina mostrou a impraticabilidade comercial da técnica de cultura à superfície e daí o preferir-se a cultura submersa, em grandes fermentadores.

As fases de fabrico da estreptomomicina consistem, como para todos os antibióticos obtidos bio-sinteticamente, na fermentação, extracção e purificação.

O primeiro passo para a produção da estreptomomicina decorre no laboratório ao qual compete obter uma grande quantidade de esporos próprios para a produção de culturas de *S. griseus*. Partem de uma cultura em gelose deste microorganismo, conservada ao abrigo do ar e da luz, à temperatura de 4º, da qual fazem uma sementeira em frascos de ROUX contendo um meio apropriado para uma esporulação activa.

Obtidas as suspensões de esporos, passam à multiplicação do micélio, de início em balões contendo o meio de cultura que é devidamente agitado e, em seguida, transferido para tanques de repicagem, de algumas centenas de litros, também designados por germinadores, e destes para fermentadores cuja capacidade é já da ordem de dezenas de milhares de litros ⁽¹¹⁾.

A quantidade de estreptomomicina produzida é condicionada não só pela estirpe de *S. griseus*, como também pela composição do meio de cultura. Além do extracto de carne e do «Corn-Steep-Liquor» mostraram-se muito convenientes para a fermentação submersa outras fontes de azoto, como a peptona, o autolisado de levedura, a farinha de soja, a caseína, a farinha de sementes de algodão, etc. e as respectivas combinações ^(12, 13). Como fontes energéticas podem utilizar-se a glicose, a fructose, o amido e também a glicerina. Vários glicerídeos, a banha e o óleo de soja, podem servir com idêntica finalidade ^(14, 15).

A concentração em fosfato deve ser escolhida de tal modo que durante o crescimento do micélio este elemento desapareça do caldo de alimentação e apenas ressurja na autólise. Se ele estiver presente durante toda a fermentação, obtém-se um bom crescimento do micélio, mas a produção da estreptomomicina diminui ⁽¹⁶⁾; cabe, a propósito, referir que as estirpes de *S. griseus* B-178 e L-S-1 só se desenvolvem apreciavelmente em presença de fosfatos solúveis. O fósforo sob forma insolúvel, tal como a fitina e o fosfato de cálcio, origina um crescimento limitado, diminuindo a produção de estreptomomicina. Concentrados de extractos de milho a 0,25 por cento proporcionam maiores concentrações de antibiótico. Em meios complexos a concentração óptima de fosfato deve

estar compreendida entre 4,5 e 11,5 mg por cento, dependendo o consumo do fosfatião dos componentes do meio de cultura (17). Elementos inorgânicos em quantidades ínfimas, devem também ser adicionados aos meios de fermentação, particularmente aos de origem sintética.

Durante a fermentação, mantém-se a temperatura entre 25° a 30°, devendo-se controlar a administração da quantidade de ar estéril. Se necessário, poder-se-á juntar um produto anti-espumante isento de propriedades tóxicas. O tempo da fermentação principal é, conforme a estirpe e o meio de cultura, de 4 a 5 dias.

Embora a quantidade de estreptomina produzida não diminua com a contaminação bacteriana, no entanto, a filtração de um caldo de fermentação contaminado e a extracção do antibiótico deste são bastante dificultadas. O maior problema, contudo, reside nos bacteriófagos, cuja contaminação é difícil de combater, podendo mesmo atingir as culturas subsequentes. Todavia, ultimamente, foram obtidas estirpes resistentes à fagocitose pelos bacteriófagos (18, 19).

Atingida a concentração óptima da estreptomina nos fermentadores, o desenvolvimento da cultura é suspenso, procedendo-se, em seguida, à extracção do antibiótico e, finalmente, à sua purificação.

Assim, separa-se, em primeiro lugar, o micélio do caldo de fermentação, extraindo-se, depois, o antibiótico do filtrado por processos de adsorção. Para esse efeito usam-se modernamente, as resinas permutadoras de iões, em substituição dos processos iniciais que empregavam o carvão activado. A estreptomina poderá ser extraída dos eluatos, concentrando estes e precipitando-a pela adição de acetona ou de cloreto de cálcio, que neste caso originará o sal duplo de estreptomina-cloreto de cálcio.

Nos processos de purificação recorre-se, novamente, aos métodos de adsorção e à formação do sal duplo. Numerosas patentes indicam também diversos agentes oxidantes capazes de eliminar substâncias tóxicas, pirogênicas e outras de comportamento semelhante à histamina, que podem acompanhar a estreptomina. Na fase final da purificação, o antibiótico é dissolvido assépticamente em água aprotogénica, seguindo-se uma passagem por ultra-filtro para eliminar qualquer microorganismo e, por fim, secagem por liofilização.

A estreptomina foi, na verdade, o primeiro medicamento que actuou decisivamente no tratamento da meningite tuberculosa e na tuberculose pulmonar. No entanto, quando administrada em altas doses, e por tempo apreciável, revela uma certa

toxicidade sobre o sistema nervoso, que se manifesta, sobretudo, por perturbações no sentido do equilíbrio, e, em menor escala, sobre o aparelho auditivo.

Na esperança de se obterem derivados da estreptomina menos tóxicos foram estudados numerosos compostos entre os quais a di-hidro-estreptomina. Este antibiótico é produzido, comercialmente, por hidrogenação catalítica de uma solução de cloridrato ou de sulfato de estreptomina, ou ainda de uma solução contendo o complexo cristalino cloreto de cálcio-estreptomina, usando hidrogénio à pressão de 1 a 4 atmosferas e em presença de óxido de platina, como catalisador (7, 8, 20, 21). Nestas condições, são fixados, no grupo aldeídico da molécula da estreptomina, dois átomos de hidrogénio, resultando um produto ligeiramente mais estável que a substância original (7, 8, 9). Se a hidrogenação é conduzida sobre o sal duplo de cloreto de cálcio e estreptomina, uma vez que a di-hidro-estreptomina não forma complexos com o cloreto de cálcio, este será removido após hidrogenação. Partindo de um cloridrato de estreptomina pura, bastará retirar o catalisador por filtração e proceder à liofilização para se obter o cloridrato de di-hidro-estreptomina.

A di-hidro-estreptomina tem o mesmo grau de actividade anti-bacteriana que a estreptomina, embora, por vezes, seja menos activa sobre alguns microorganismos gram-negativos. É certo que ela se mostra menos prejudicial para o nervo vestibular, mas em contrapartida, actua mais acentuadamente sobre o ouvido provocando perturbações irreversíveis.

Verifica-se, contudo, que a estreptomina é ainda uma arma de eleição no combate a certas formas de tuberculose, no qual o aparecimento rápido de germens resistentes pode ser evitado por associação com o ácido *p*-amino-salicílico ou com a hidrazida do ácido nicotínico. Queremos ainda referir duas das suas indicações mais interessantes, ou seja, na preparação pré-operatória e na disseminação bacilar post-operatória.

Além da tuberculose, a estreptomina é útil no tratamento da peste (em associação com a sulfadiazina), nas infecções provocadas pelo *Proteus vulgaris* e pelo *Streptobacillus moniliformes* e na endocardite sub-aguda devida ao *Streptococcus faecalis* (em associação com a penicilina).

Recorre-se ainda à estreptomina no combate a inúmeras infecções provocadas por estirpes estreptomino-sensíveis e tornadas resistentes aos outros antibióticos disponíveis, normalmente considerados como preferíveis à estreptomina.

PROPRIEDADES QUÍMICAS E CONSTITUIÇÃO

A estreptomina é uma substância branca, de carácter fortemente básico, que forma sais neutros ao fixar três radicais ácidos. É extremamente solúvel na água, tanto sob a forma livre, como sob a forma de sais de ácidos minerais, sendo muito pouco solúvel ou mesmo insolúvel nos solventes orgânicos usuais. Não tem grupos amínicos livres, mas apresenta a reacção de SAKAGUCHI devida aos grupos guanidínicos, podendo ser hidrolisada quer pelos ácidos quer pelas bases. Enquanto que a maior parte das reacções químicas conduzem a uma inactivação da estreptomina, a hidrogenação dá um produto biologicamente activo. Não se consegue destruí-la por qualquer sistema enzimático ou biológico (22).

O antibiótico reage com numerosos reagentes carbonílicos, devido ao grupo aldeídico livre, destacando-se, como de maior interesse, a formação de oximas e de semicarbazonas (23).

Os sais de estreptomina, no estado seco e à temperatura normal, são estáveis por mais de um ano (24), mas a temperaturas elevadas inactivam-se rapidamente.

As soluções dos sais de estreptomina retêm a sua actividade por algumas semanas à temperatura ambiente, entre pH 4 a 7, podendo, no entanto, aparecer levemente coradas. Todavia, se forem conservadas em câmara frigorífica, a sua actividade mantém-se, pelo menos, por três meses. Temperaturas elevadas, ácidos e bases fortes causam perda da sua potência (25).

De um trabalho de REGNA, WASSELLE e SALOMON (24) sobre a estabilidade da estreptomina à acção do calor e, da força iónica do meio, compilámos os resultados agrupados no Quadro I. Conclui-se, deste estudo, que a estreptomina em solução se mantém estável cerca de dois meses, quando conservada a uma temperatura inferior a 20° e a um pH entre 3 a 7, enquanto que à temperatura de 28° a sua actividade é reduzida a metade em 45 dias se o pH for de 8,6, em 12 dias a pH 9,5 e em 4 dias a pH 0,8; a 95° e a pH 5,5 bastam 37 horas para reduzir a sua actividade de 50 por cento.

Soluções do antibiótico tamponadas a pH compreendido entre 6 a 8 e, mantidas à temperatura de 10° são estáveis por tempo não inferior a três meses (26). Um aquecimento a 70° por meia hora não produz apreciável perda de actividade (27, 28).

A decomposição hidrolítica pelos ácidos opera várias cisões na molécula, com formação de produtos facilmente cristalisáveis, cujo estudo permitiu o conhecimento da estrutura da estreptomina. O aquecimento em meio alcalino produz, além de outros

produtos de cisão, o maltol ⁽²⁹⁾. A oxidação pela água de bromo origina o ácido estreptomicínico, substância amorfa biologicamente inactiva ⁽⁹⁾.

QUADRO I

Tempo necessário para inactivar 50 por cento de estreptomicina pura
[seg. REGNA e col. ⁽²⁴⁾]

Valores de <i>pH</i>	Temperaturas empregues			
	70	280	500	950
0,8	1.200 horas	110 horas	8 horas	—
1,7	estável	1.500 »	90 »	—
2,7	estável	estável	900 »	—
5,5	estável	estável	4.600 »	37 horas
8,6	estável	1.100 horas	50 »	—
9,5	3.300 horas	—	16 »	—
11,2	—	—	—	—

Consideram-se como inibidores da actividade do antibiótico os catiões magnésio e cálcio, bem com os aniões nitrato, lactato, fosfato, cloreto, citrato, e tartarato ⁽³⁰⁾. O mesmo sucede com a glucose ^(31, 32), o ião cianeto ⁽³³⁾ e os agentes oxidantes, tais como o permanganato de potássio, ácido nítrico, metaperiodato de potássio e ácido clórico ⁽³⁴⁾; a cisteína, o formiato de sódio e o tiossulfato de sódio originam também uma inactivação total ou parcial, podendo a perda de actividade provocada pela cisteína desaparecer pela adição de iodo ^(22, 35, 36).

A estreptomicina forma um sal duplo cristalino com o cloreto de cálcio ⁽³⁷⁾ e sais cristalinos com diversos ácidos inorgânicos, alguns dos qua'is usados na terapêutica (o cloridrato e o sulfato). Dos sais de ácidos orgânicos cita-se com interesse terapêutico o pantotenato, servindo o heliantato e o picrato apenas para a purificação laboratorial do antibiótico ⁽³⁸⁾.

Este antibiótico origina com muitos compostos orgânicos complexos pouco solúveis, indicando-se como substâncias possuindo essa propriedade o tanino, albumina, ácido desoxi-ribo-

nucleico, timolnucleoproteína, cefalina, ácido oleico, ácido palmítico e lecitina (39).

O conhecimento da estrutura e configuração da estreptomicina deve-se, principalmente, aos trabalhos de FOLKERS, WINTERSTEINER, CARTER e WOLFROM e seus colaboradores, trabalhos que estão condensados em excelentes artigos de revisão (40, 41, 42, 43).

Indica-se na *figura 1* a fórmula de estrutura da estreptomicina, assim como os elementos constitutivos que podem ser obtidos por conveniente hidrólise ácida (44, 45, 46), compostos que se encontram unidos, na molécula do antibiótico, por ligações glucosídicas (47, 48).

A di-hidro-estreptomicina difere quimicamente da estreptomicina por ter um grupo alcoólico em substituição do grupo aldeídico livre presente na parte da molécula denominada estreptose.

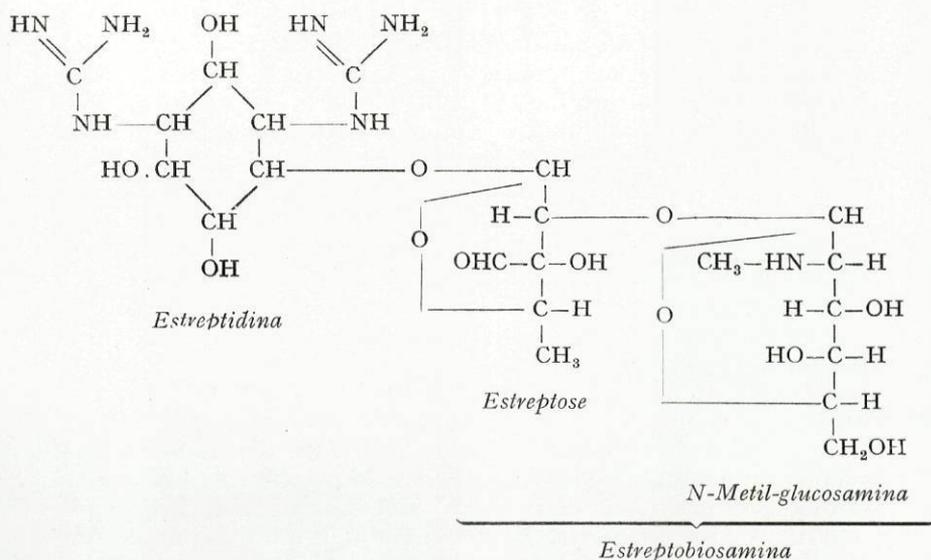


Fig. 1

Fórmula de estrutura da estreptomicina base

Este antibiótico é mais estável que a estreptomicina, particularmente aos solutos alcalinos. Não é alterado pela cisteína, nem pelos reagentes carbonílicos e não forma maltol quando aquecido com os álcalis (7, 8, 49, 50).

MÉTODOS DE DOSAGEM

São dois, fundamentalmente, os tipos de processos indicados na dosagem destes antibióticos: processos microbiológicos e processos físico-químicos. Os primeiros baseiam-se na determinação da actividade antibacteriana do antibiótico sobre um germen escolhido como padrão. Os processos físico-químicos são usados de preferência quando se pretenda uma dosagem rápida ou se deseje determinar a actividade do antibiótico em presença de outros, nos casos em que não se possa usar o processo microbiológico.

a) Processos microbiológicos

A actividade do antibiótico pode ser apreciada por dois métodos: num, o grau de inibição do antibiótico é medido recorrendo-se a uma cultura do germen-teste em meio sólido (método por difusão em gelose), noutra, utiliza-se um meio líquido (método de diluição ou turbidimétrico).

Embora, inicialmente, outros microorganismos padrões tenham sido propostos para a dosagem destes antibióticos, presentemente as Farmacopeias e diversos métodos oficiais como os promulgados pela secção 507 da «Federal Food, Drug and Cosmetic Act» empregam, exclusivamente, *Bacillus subtilis* para a técnica de difusão em placa de gelose e *Klebsiella pneumoniae* para a técnica turbidimétrica.

A estreptomicina oferece a particularidade de ser bastante sensível às variações de pH dos meios de cultura onde é doseada. Assim, determinada respectivamente a pH 7,0 e a pH 7,8 obtêm-se diferenças de actividade da ordem dos 30 por cento. Em relação ao diâmetro das zonas de inibição, o método de escavação-placa, executado com estirpe de *B. subtilis*, antige um máximo de sensibilidade a pH 8,5. Segundo Loo e col. (51), esse máximo de sensibilidade seria a pH $7,9 \pm 0,1$, valor este que garante melhores condições de estabilidade ao antibiótico. Outros investigadores (24, 52, 53) depressa confirmaram estas observações, tendo-se, por isso, adoptado quer no método de diluição quer no método do cilindro-placa, o emprego de meios tamponados entre pH 7,6 e 8,0.

Todos os Autores estão de acordo quanto à influência da composição do meio de cultura e da concentração do *inoculum* na obtenção de resultados reprodutíveis. Este problema foi tratado,

pormenorizadamente, por LOO e *col.* (51) e também por MAY, VOUREKA e FLEMING (53) que demonstraram bem a importância daqueles factores.

1 — Método turbidimétrico

A primeira «unidade de actividade» proposta para a estreptomomicina foi expressa pela quantidade capaz de impedir o crescimento de uma estirpe de *Bacterium coli* em caldo de cultura. Nestas condições, o método turbidimétrico apresentava uma precisão de ± 15 por cento (54). DONOVICK e *col.* (55) conseguiram mais tarde uma precisão da ordem de 10,3 por cento, empregando *B. friedländer*. O método, que, finalmente, foi padronizado, utiliza como microorganismo *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, visto ter-se observado ser este o gérmen mais sensível, possuindo a dosagem, nestas condições, uma precisão de cerca de 10 por cento.

Dos métodos microbiológicos verificou-se ser o método turbidimétrico o mais preciso e menos sujeito a variações de ordem biológica. No entanto, para se atingir tal precisão é indispensável usar um elevado número de tubos, o que torna o método mais trabalhoso e demorado que o do cilindro-placa. Um outro inconveniente do método turbidimétrico reside no facto de não poder ser utilizado na dosagem da estreptomomicina e da di-hidro-estreptomomicina no sangue e em outros líquidos biológicos, assim como em certas formas farmacêuticas. Deve-se este facto quer à presença de certos produtos capazes de inibir ou estimular o crescimento do gérmen-teste, quer à existência de substâncias coradas ou que originem turvações, umas e outras susceptíveis de interferir na luz transmitida.

2 — Métodos de difusão

Tanto no método de escavação-placa, como no de cilindro-placa, se utilizou, inicialmente, o microorganismo-teste *Bacterium coli*; contudo, depressa se verificou ser possível obter melhores resultados em presença de estirpes sensíveis de *Bacillus subtilis* (24, 51, 52).

O método do cilindro-placa é o proposto na maioria das Farmacopeias, podendo-se seguir qualquer dos dois processos que transcrevemos do suplemento à 2.^a edição da IV Farmacopeia Portuguesa.

I — Preparam-se duas soluções do padrão em concentrações indicadas para cada caso e do mesmo modo soluções da amostra a

ensaiar, que presumivelmente tenham a mesma actividade das diluições do padrão. Utilizam-se quatro placas, cada uma com quatro cilindros dispostos nos vértices de um quadrado com 6 cm de diagonal. Em cada dois cilindros alternados, da mesma placa, lança-se no primeiro a solução do padrão na concentração maior e no segundo a de concentração menor. Nos outros cilindros vertem-se pela mesma ordem as soluções da amostra a ensaiar. As placas são colocadas na estufa a 32-35° durante 16 a 18 horas. Medidos os diâmetros das zonas de inibição do padrão e da amostra, pode calcular-se a *actividade do antibiótico* desta e, por métodos estatísticos adequados, a exactidão do ensaio. A percentagem de *actividade antibiótica* da amostra é dada pela seguinte fórmula :

$$X = \text{antilog.} \left(2 + \frac{(A + a) - (S + s)}{(S + A) - (s + a)} \times \log d \right)$$

sendo:

A e *a*, médias dos diâmetros das zonas de inibição obtidas com a amostra do antibiótico a ensaiar, respectivamente nas concentrações maior e menor.

S e *s*, médias dos diâmetros das zonas de inibição obtidas com o padrão, respectivamente, nas concentrações maior e menor.

d, relação das concentrações maior e menor.

II — Preparam-se diversas soluções do padrão em concentrações convenientes. Utilizando placas com seis cilindros, distribui-se, alternadamente, em três deles e em cada grupo de três placas, cada uma das diversas soluções, à excepção da concentração mediana que é distribuída nos restantes cilindros e em todos os grupos. As placas são colocadas na estufa a 32-35° durante 16 a 18 horas e medem-se os diâmetros das zonas de inibição. Em cada grupo de três placas determinam-se as medidas dos diâmetros correspondentes a cada uma das concentrações. Calcula-se a média de todas as medidas correspondente à concentração mediana e em relação a este valor corrigem-se os números encontrados para as diferentes concentrações conforme a seguir se descreve. Assim, se a média geral dos diâmetros de concentração média for *M* (em milímetros) e a média dos diâmetros da mesma concentração em determinado grupo for *M*₁, corrige-se a média dos diâmetros *M*₂, do referido grupo, pela seguinte expressão:

$$M_2 \text{ (corrigido)} = M_2 + (M - M_1)$$

Com os valores corrigidos deste modo, constrói-se um gráfico, que é a *curva-padrão*.

Para determinar a *actividade antibiótica* da amostra a ensaiar prepara-se a solução do padrão em concentração conveniente e

outra idêntica da amostra por estimativa. Distribui-se alternadamente cada uma das soluções em três cilindros de cada placa de um grupo de três placas. Medidos os diâmetros das zonas de inibição depois de incubação na estufa, calcula-se a média dos valores encontrados para o padrão e para a amostra a ensaiar.

Corrigido o valor encontrado para a amostra (M_2), tomando como valor de M o que serviu para a construção da *curva-padrão* e com M_1 a média obtida no ensaio com o padrão, calcula-se a concentração da amostra por leitura directa da mesma curva.

Finalmente, queremos referir ao método que emprega, em vez de cilindros, discos de papel de filtro de porosidade conveniente, impregnados de antibiótico.

Com fins qualitativos é este método muito usado em análises de aplicação à clínica, na determinação do chamado antibiograma. No entanto o método dos discos de papel tem sido também empregue na dosagem de novos antibióticos, substituindo o método do cilindro-placa. Numerosas referências se encontram na literatura sobre a aplicação deste método com fins analíticos (^{56, 57, 58, 59, 60, 61, 62}), que, quando devidamente executado, conduz a resultados satisfatórios.

b) Métodos físico-químicos

Um dos métodos físico-químicos mais antigos deve-se à observação feita por SCHENCK e SPIELMAN (⁶³) de que a estreptomicina em meio alcalino origina maltol. Esta substância tem um máximo de absorção característico em solução ácida ou alcalina. BOXER e *col.* (⁶⁴) determinaram a estreptomicina, fazendo reagir o maltol com o cloreto férrico e medindo, a 550 $m\mu$, a coloração vermelho púrpura, obtida. Com o reagente fenólico de FOLIN e CIO-CALTEAU (⁶⁵), a reacção torna-se mais sensível, o que permite dosar, como limite inferior, 50 $\mu g/ml$ de estreptomicina. Dado que os solutos injectáveis deste antibiótico contêm substâncias estabilizadoras e conservadoras (bissulfito, fenol, etc.), capazes de interferir na coloração, é preferível medir o maltol, que se formou, espectrofotometricamente, no ultravioleta em 325 $m\mu$. Como a di-hidro-estreptomicina não pode formar maltol, esta reacção é específica para a estreptomicina, podendo, por isso, dosar-se este antibiótico mesmo em presença da di-hidro-estreptomicina. Por este motivo, as Farmacopeias indicam este processo para a dosagem da estreptomicina em preparações que a contenham em conjunto com a di-hidro-estreptomicina. Esta reacção do maltol permite a dosagem da estreptomicina não só em produtos puros como também em líquidos biológicos, e em caldos de cultura. Em

amostras puras, pode ser determinado o maltol directamente sem ser necessária a separação deste, enquanto que, em presença de uma estreptomocina impura, essa separação deve ser realizada, recorrendo-se à sua extracção por solventes orgânicos (clorofórmio), ou à destilação por corrente de vapor ^(66, 67, 68). MARS-HALL e *col.* ⁽⁶⁹⁾ estudaram, principalmente, a reacção do maltol na dosagem da estreptomocina na urina. Por estes Autores foi também estudado um método que se baseia na reacção do grupo aldeídico da estreptomocina com a semicarbazida [4-(4-*p*-clorofenilazo)-1-naftol]-semicarbazida, cujo derivado formado é doseável colorimètricamente. Para a determinação da estreptomocina no sangue, BOXER e JELINER ⁽⁷⁰⁾ estudaram um método idèntico no qual empregam como reagente a 9-hidrazino-acridina.

O método do maltol foi ainda modificado por FERRARI ⁽⁷¹⁾, o qual, servindo-se de uma aparelhagem de certo modo complicada, de princípios idènticos à que applicou para a dosagem da penicilina, permitiu a dosagem da estreptomocina em caldos de cultura.

Além do método do maltol, a estreptomocina pode ser doseada pelo método proposto por DELABY e STEPHAN ⁽⁷²⁾, que se fundamenta no processo utilizado por BOUGOULT e GROSS ⁽⁷³⁾ para a determinação dos aldeídos orgânicos pelo reagente de NESSLER. Esse método apenas permite, em determinadas condições, a dosagem da estreptomocina e seus sais, e não a da di-hidro-estreptomocina e seus derivados. O reagente de NESSLER é reduzido, a frio, a mercúrio metálico pela estreptomocina, redução que se passa rapidamente em presença de iodeto de potássio. A di-hidro-estreptomocina reduz esse reagente nas mesmas condições, mas apenas até ao estado de mercúrio mercurioso, e só por aquecimento o processo de redução continuaria. Assim, temos um método simples e rápido, que na ausência de substâncias redutoras, nos indica a presença de estreptomocina. Se a amostra for de di-hidro-estreptomocina não se obtém precipitado pela adição do reagente de NESSLER e de iodeto de potássio. Deste modo, a estreptomocina pode ser doseada mesmo em presença da di-hidro-estreptomocina, pois a quantidade de mercúrio metálico formado é proporcional à quantidade de estreptomocina presente. Na prática, esta dosagem é efectuada iodomètricamente, juntando-se uma quantidade conhecida de solução de iodo em meio ácido ao mercúrio metálico formado e doseando o excesso de iodo com solução de tiosulfato de sódio.

DELABY e STEPHAN ⁽⁷²⁾ também estudaram um outro processo de oxidação baseado nas experiências de FLEURY e LANGE ⁽⁷⁴⁾ em

que utilizam o ácido periódico, como agente oxidante. Já em 1928 MALAPRADE descobriu a possibilidade de o ácido periódico oxidar as substâncias glicólicas e o interesse da sua aplicação no campo analítico, mas só com os trabalhos de FLEURY e LANGE esta técnica foi desenvolvida convenientemente. DELABY e STEPHAN só depois de estudarem as condições óptimas de reacção, nas quais tem um papel primordial a temperatura, o tempo e a força iónica do meio, puderam tornar o processo de oxidação reprodutível. Recorre-se, também aqui à técnica iodométrica, na qual o ácido periódico não consumido na oxidação da estreptomina é reduzido por um excesso de arsenito de potássio, doseando-se depois o arsenito não consumido por solução de iodo.

Para a dosagem da di-hidro-estreptomina, foram estudados métodos em que se faz a oxidação periódica do antibiótico e a subsequente dosagem colorimétrica do formaldeído libertado. GARLOCK e GROVE (75) escolheram como meio oxidante o periodato de sódio enquanto que COLON e col. (76) utilizaram o ácido periódico. Em ambos os casos, o formaldeído libertado é destilado por corrente de vapor e recebido numa solução de bissulfito de sódio, sendo, depois, determinado colorimetricamente pelo ácido cromotrópico. A necessidade de uma destilação cuidadosa foi evitada por VAIL e BRICKER (77) que eliminam os ácidos periódico e iódico por precipitação destes com solução de acetato de chumbo. Este método tem sido usado em combinação com o método de maltol, tendo em vista a análise de misturas de sais de estreptomina.

Além dos métodos, que envolvem a oxidação periódica, referidos para a di-hidro-estreptomina, este antibiótico pode ser ainda determinado pelo processo espectrofotométrico de HISCOX (78). Baseia-se este processo no facto da di-hidro-estreptomina, após hidrólise ácida a quente, apresentar um máximo de absorção a 265 $m\mu$, enquanto que a estreptomina mostra um máximo em 245 $m\mu$ e outro em 315 $m\mu$. Daí a estreptomina não interferir, a não ser que esteja presente em grandes quantidades. Como a di-hidro-estreptomina comercial não deve ter mais de 3 por cento de estreptomina, essa quantidade não exerce qualquer influência neste método. No que se refere à comodidade, especificidade e precisão, este processo espectrofotométrico é, certamente o método de escolha para a dosagem da di-hidro-estreptomina em amostras puras, contendo pelo menos, 0,2 mg de antibiótico.

Num outro grupo de métodos colorimétricos, a dosagem é baseada na presença de estreptidina ou de N-metil-glucosamina

na molécula de ambos os antibióticos. SULLIVAN e HILMER (79) estudaram um método de dosagem para a estreptomicina que se fundamenta na existência de estreptidina na sua molécula. Mais tarde, MONASTERO (80) aplicou essa técnica à determinação da di-hidro-estreptomicina. O processo é caracterizado pelo aparecimento de uma coloração vermelho-alaranjada quando se adiciona uma solução alcalina de nitroprussiato de sódio e de ferricianeto de potássio a soluções diluídas de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina. A cor é proporcional à concentração dos antibióticos, tendo um máximo de absorção em 490 m μ . Como a formação da cor é atribuída à estreptidina, a reacção é positiva quer o antibiótico se encontre intacto ou tenha sofrido uma decomposição em que se liberte estreptidina. Isto constituirá uma desvantagem do método, visto não haver possibilidade de dosear a estreptidina num ensaio em branco. Esta existe contudo, nas soluções, em pequena concentração, devido à sua fraca solubilidade na água. A presença de metanol, assim como a existência de cloreto de sódio ou de sulfato de sódio, em quantidades superiores a 0,5 por cento, interferem no método por reduzirem a intensidade da coloração formada.

Com o fim de evitar a acção prejudicial dos sais e do metanol sobre o método do nitroprussiato, SZAFIR e BENNETT (81), e outros investigadores estabeleceram métodos de dosagem para a estreptomicina, baseando-se na existência de grupos guanidínicos na sua molécula. Também ALBANASE e FRANKSTON (82) bem como VICENT e BRYGOO (83) estudaram o emprego da reacção de SAKAGUCHI (84) à dosagem da estreptomicina e da di-hidro-estreptomicina, tendo os primeiros Autores usado, para esse efeito, o hipoclorito e os segundos, o hipobromito. SAKAGUCHI (85) e outros (86), aplicaram a reacção, que tomou o nome do referido Autor, à dosagem da arginina, tendo TIBALDI (87) modificado esse método para a determinação da estreptomicina e di-hidro-estreptomicina no soro e em urinas normais e patológicas. O processo proposto por TROUGHT (88) para as aminas aromáticas satisfaz igualmente para a dosagem da di-hidro-estreptomicina; contudo, como no método do nitroprussiato, faz-se também sentir a interferência dos sais.

Pouco tempo após a descoberta da estreptomicina SCUDI, BOXER e JELINER (89) verificaram que este antibiótico dá uma coloração idêntica à da glucosamina pela reacção de ELSON-MORGAN (90). Embora a substituição, no reagente, do carbonato de sódio pelo hidróxido de sódio viesse tornar a reacção menos sensível para a glucosamina, este método só poderá ser aplicado a

amostras puras de estreptomina. O método é igualmente aplicável à di-hidro-estreptomina, sendo, no entanto, de menor sensibilidade a intensidade de coloração, pois esta é 1/24 da intensidade obtida com igual quantidade de estreptomina.

O método de dosagem introduzido por SCUDI e *col.* foi modificado por KAMATA ⁽⁹¹⁾ empregando o carbonato de sódio proposto inicialmente, mas favorecendo a libertação do CO₂ formado. O processo, no entanto, é trabalhoso e demorado.

Se bem que aplicável à estreptomina, o processo de SCUDI e *col.* não satisfaz para a di-hidro-estreptomina tendo WEISS ⁽⁹²⁾ estudado para este antibiótico, um método colorimétrico que é específico para a di-hidro-estreptomina mesmo em presença da estreptomina. Fervendo-se uma solução de di-hidro-estreptomina, que previamente foi hidrolisada por um ácido, com α -naftol em meio fortemente alcalino, obtém-se uma coloração vermelha. O referido Autor, ao estudar o comportamento de misturas de antibióticos, verificou que a coloração vermelha apenas se obtinha nas misturas que contivessem di-hidro-estreptomina. Observou, também, que os produtos de decomposição da di-hidro-estreptomina (estreptidina, estreptose e N-metil-glucosamina) não reagem, nas condições do ensaio, com o α -naftol. Apenas um produto de redução da estreptomina — a di-hidro-desoxi-estreptomina — origina coloração vermelha, mas de menor intensidade (cerca de 10 por cento inferior em relação à da di-hidro-estreptomina).

A *Farmacopeia Francesa* de 1949 inscreve um processo acidimétrico que é aplicável tanto ao sulfato de estreptomina como ao de di-hidro-estreptomina. Partindo de um dado volume de solução de qualquer destes antibióticos, titula-se como hidróxido de sódio em presença de timolftaleína. Este processo é o proposto também pelo *suplemento* à 2.^a edição da *IV Farmacopeia Portuguesa* na dosagem destes antibióticos. MACHEK ⁽⁹³⁾, recentemente, aplicou, com bons resultados, este método à estreptomina em presença da penicilina.

VOGT ⁽⁹⁴⁾ descreve um método potenciométrico para a dosagem de «reinekatos» destes dois antibióticos, que são obtidos segundo a técnica descrita por FRIED e WINTERSTEINER ⁽⁹⁵⁾.

Um método rápido para a dosagem da estreptomina e di-hidro-estreptomina foi descrito por NATARAJAN e TAYAL ⁽⁹⁶⁾ o qual se baseia no método de VINCENT e BRYGOO ⁽⁸³⁾, atrás descrito.

Finalmente, mencionaremos o método proposto por VIALA (97) em que se doseia o azoto proveniente da molécula da estreptomina ou da di-hidro-estreptomina, por processo manométrico. Esse azoto resulta da parte da molécula do antibiótico correspondente à estreptodina e, por esse motivo, o método só poderá ser aplicado a amostras de elevado grau de pureza.

*

*

*

Dentro ainda da presente classe de métodos de dosagem da estreptomina e antibióticos afins, deveremos referir-nos aos que recorrem à conhecida técnica polarográfica. Na verdade, diversos estudos têm sido realizados sobre a aplicação desta técnica na determinação da estreptomina, os quais, embora relativamente antigos, não deixam de oferecer interessantes perspectivas, como consequência do incremento que a polarografia tem tomado nos últimos dez anos. De resto, a referência a tais estudos torna-se tanto mais oportuna quanto é certo terem constituído ponto de partida para a elaboração do método proposto neste trabalho para a dosagem da estreptomina, método esse que veio também a beneficiar das notáveis possibilidades criadas pelo emprego de polarógrafos de maior sensibilidade.

O primeiro método polarográfico descrito para a estreptomina deve-se a LEVY e col. (98) que dosearam este antibiótico em amostras contendo mais de 200 $\mu\text{g/ml}$. A amostra a *polarografar* deveria estar convenientemente purificada, uma vez que alguns dos compostos existentes nos meios de cultura podem interferir no método polarográfico. Indicaram como electrólito de suporte a solução de hidróxido de tetrametilamónio a 3% de *pH* 13,6-13,8, tendo-se verificado boa concordância entre o método polarográfico e o microbiológico. Em 25 amostras contendo 70 a 800 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina observaram um desvio máximo de ± 6 por cento em relação aos dois métodos.

BRICKER e VAIL (99) demonstraram, mais tarde, que o comportamento polarográfico deste antibiótico em função da concentração hidrogeniônica do meio é análogo ao do formaldeído, dando outros pormenores do mecanismo de redução da estreptomina. Estes mesmos investigadores concluíram não ser possível distinguir polarograficamente a manosido-estreptomina da estrepto-

micina, visto a redução se operar a potenciais de semi-onda idênticos.

Para a dosagem deste antibiótico outros electrólitos têm sido propostos, tais como a solução de metanol a 90 % contendo 1 % de cloreto de lítio, citada por HEUSER e col. (100) e, a solução de hidróxido de sódio normal (101).

Logo após a descoberta da estreptomina, KUEHL e col. (102) e também PECK e col. (7) observaram que tanto a estreptomina como a di-hidro-estreptomina davam sais insolúveis com corantes aniônicos. A capacidade de redução polarográfica destes corantes tornou possível a dosagem dos citados antibióticos determinando polarograficamente o excesso de corante não consumido na precipitação do antibiótico. CONN e NORMAN (103) observaram o comportamento de 70 corantes azóicos, tendo chegado à conclusão de que o corante obtido por condensação do ácido 1-naftol-4-sulfónico com a *p*-rosanilina diazotada, é dos mais convenientes para este tipo de reacção. Estes Autores empregaram como electrólito-suporte um tampão de citrato de trietanolamina de *pH* 2,8, usando um padrão interno, uma vez que a formação do precipitado corante-antibiótico não é estequiométrica.

*

*

*

Embora a cromatografia e a electroforese em papel não tenham sido empregues, directamente, como métodos de dosagem da estreptomina e da di-hidro-estreptomina, têm servido, contudo, para a separação e identificação destes antibióticos em misturas mais ou menos complexas.

Tendo em conta a orientação dada à segunda parte do nosso trabalho—dosagem de sais de estreptomina e de di-hidro-estreptomina empregando como processo separativo a cromatografia e a electroforese—justifica-se, plenamente, uma revisão bastante pormenorizada das diferentes técnicas usadas para estes antibióticos, na qual se fará também a descrição dos métodos de revelação das respectivas *manchas*.

Processos cromatográficos

Como resultado lógico da divulgação e simplicidade técnica da cromatografia em papel, como método de análise qualitativa e como processo auxiliar na análise quantitativa, cedo se verifi-

cou o seu emprego na separação e identificação da estreptomicina e da di-hidro-estreptomicina.

A separação e caracterização da estreptomicina pode ser facilmente executada pelo método proposto por HORNE e POLLARD (104). Estes Autores praticam a técnica cromatográfica ascendente em tiras de papel WHATMAN n.º 2 de 12 mm de largura, usando como *desenvolvente* a solução de cloreto de amónio a 3 por cento. Nestas condições, a estreptomicina apresenta um *Rf* que varia entre 0,80 e 0,86, sendo a revelação das *manchas* feita quer por via química quer por via microbiológica.

A revelação por via química baseia-se na reacção de SAKAGUCHI para a identificação dos grupos guanidínicos, sendo executada pela seguinte técnica:

A tira de papel sofre uma pulverização com solução de hidróxido de sódio N/2 e imediatamente uma segunda pulverização com solução alcoólica de α -naftol a 0,25 %; após dois minutos de contacto, segue-se uma pulverização com água de Javel. As *manchas* de estreptomicina coram de vermelho-vivo, coloração esta que é bastante fugaz.

Na revelação por técnica microbiológica, processo que apresenta um carácter mais geral, o cromatograma é posto em contacto com uma placa de gelosa semeada com gérmen sensível, observando-se, após incubação, as zonas de inibição correspondentes às *manchas* do antibiótico no cromatograma. HORNE e POLLARD utilizaram para esta revelação tinas do tipo corrente, com dimensões adequadas ao comprimento dos cromatogramas a revelar, nas quais é vertida uma primeira camada de meio de cultura com a seguinte composição:

Glicose	1 g
Extracto de levedura.	3 g
Peptona	10 g
Gelosa.	15 g
Água destilada.	1000 ml

Sobre esta gelosa de base adicionam uma segunda camada constituída pelo mesmo meio de cultura, no qual foi incorporada quantidade apropriada de suspensão de esporos de *B. subtilis*. Preparadas assim as tinas, aplicam os cromatogramas, deixando-os em contacto com a gelosa por 15 minutos. Após esse tempo de actuação, necessário para se dar a difusão do antibiótico, as tiras são retiradas e as tinas colocadas na estufa a 37º durante uma noite. Finalmente, as zonas de inibição que se formam são desenhadas, à transparência, em papel vegetal.

Salientam os Autores a óptima qualidade dos autobiogramas, que se pode considerar superior, mesmo, à obtida nos cromatogramas revelados por via química, para o que contribui a diferença de sensibilidade dos dois tipos de revelação: enquanto pelo reagente de SAKAGUCHI apenas é possível revelar 2 a 3 μg de estreptomicina, na revelação microbiológica é suficiente a presença de 0,2 a 0,4 μg de antibiótico.

Uma vez que o método de HORNE e POLLARD não permite a separação de misturas de estreptomicina, manosido-estreptomicina e respectivos derivados hidrogenados, WINSTEN e EIGEN (¹⁰⁵) procuraram fazê-lo recorrendo aos seguintes *desenvolventes*:

- Colidina com 2 por cento de piperidina.
- Lutidina com 2 por cento de piperidina.
- Mistura de *n*-butanol saturado com água e de piperidina (98 vol./2 vol.) adicionada de 2 por cento de ácido *p*-tolueno-sulfónico mono-hidratado, apresentando um *pH* final de 10,7.

Com o primeiro *desenvolvente* conseguem obter a separação dos antibióticos, mas com um tempo de desenvolvimento excessivamente longo (2 a 3 semanas). Quanto ao *desenvolvente* à base de lutidina verificaram não permitir a separação da estreptomicina B (manosido-estreptomicina). Já com o terceiro *desenvolvente* separam perfeitamente as estreptomicinas e os seus derivados hidrogenados, embora com um tempo de desenvolvimento não inferior a 48 horas.

Estes Autores não fazem referência a qualquer revelação por via química, empregando em todos os casos a revelação microbiológica, que no entanto, difere da praticada por HORNE e POLLARD, pois, além de uma prévia lavagem com éter anidro, os cromatogramas são colocados por 5 minutos sobre placas de gelosa inoculadas com *Staphylococcus aureus*.

Um outro trabalho cromatográfico que interessa focar é o de PETERSON e REINEKE (¹⁰⁶), realizado com a finalidade de se verificar a influência de vários sais na separação cromatográfica de antibióticos existentes em filtrados de culturas de *S. griseus*. Estes Autores, modificando as condições gerais do processo cromatográfico descrito por TITUS e FRIED (¹⁰⁷), para a separação da manosido-estreptomicina da estreptomicina, usaram como *desenvolvente* *n*-butanol saturado de água, contendo 2% de ácido *p*-tolueno-sulfónico, mono-hidratado, no estudo cromatográfico de misturas constituídas por estreptomicina, di-hidro-estreptomicina e neomicina. Utilizaram para qualquer destes antibióticos a reve-

lação microbiológica, empregando como microorganismo-teste o *B. subtilis*. Colocam os cromatogramas, depois de secos, por 8 minutos sobre a superfície do meio de cultura contido em caixas de «Pyrex» de 32×48 cm (*). Depois desse tempo de contacto, os cromatogramas são retirados e as placas incubadas a 37° por 15 horas. As zonas de inibição formadas são depois fotografadas segundo a técnica de DRAKE (108): emprego de luz polarizada para iluminar as tinas que, por sua vez, estão colocadas sobre uma superfície negra inactiva.

A separação da estreptomycinina de antibióticos de estrutura próxima, produzidos, também, por *Streptomyces* (neomicina, estreptotolina, estreptotricina) foi igualmente realizada, em boas condições (109), pela técnica cromatográfica descrita por PETERSON e REINECKE (106).

Finalmente, queremos referir-nos a um processo original descrito por ISHIDA e col. (110) capaz de separar o grupo das estreptotricinas da estreptomycinina. A particularidade desta técnica cromatográfica reside no facto de o *desenvolvente* possuir na sua composição um agente precipitante dos antibióticos. Com essa finalidade, escolheram a heliantina, apresentando o *desenvolvente* a seguinte composição:

<i>n</i> -Butanol	40	ml
Metanol	10	ml
Água destilada	20	ml
Heliantina	1,5	g

Operam por técnica ascendente, recorrendo a tiras de papel de filtro de 1×15 cm, sendo o tempo de desenvolvimento bastante curto (120 minutos). Após secagem, a tira apresenta o aspecto típico de uma análise capilar da heliantina. A revelação dos cromatogramas em gelosa semeada de *B. subtilis* mostra que a estreptomycinina, tal como sucede com a heliantina, possui um *Rf* de 0,6,

(*) A preparação das caixas de «Pyrex» a usar na revelação microbiológica foi efectuada deste modo:

Lançaram primeiro 200 ml de uma gelosa Difco própria para a dosagem da estreptomycinina e, depois da sua solidificação, 100 ml do mesmo meio, ao qual adicionaram 1,0 ml de suspensão de esporos de *B. subtilis*, previamente ajustada a uma concentração de 5×10^{10} esporos por ml.

As placas, depois de cobertas, devem ser conservadas a 4° até ao momento de serem utilizadas. Acontece que, nestas condições se formam gotas, por condensação, na superfície interior das tampas e que devem ser retiradas na altura em que os electroforegramas são postos a revelar.

enquanto que a estreptotricina fica no ponto de aplicação ou se desloca para um valor de $Rf = 0,3$, conforme pertence ao tipo II ou ao tipo I. No decorrer da cromatografia, ter-se-iam formado heliantatos cujas solubilidades no *desenvolvente* indicado seriam diferentes para cada antibiótico.

Processos electroforéticos

Um dos primeiros trabalhos de aplicação da electroforese em papel ao estudo da estreptomomicina e outras substâncias com ela relacionadas, que nos aparece descrito na literatura da especialidade, deve-se a FOSTER e ASHTON (¹¹¹). Estes Autores mostraram ser possível separar a estreptomomicina, a manosido-estreptomomicina e outras substâncias afins por electroforese em papel. Usaram técnica semelhante à empregue por HOSOYA e *col.* (¹¹²) e por KING e DOERY (¹¹³) no estudo de novos antibióticos a partir de caldos de fermentação. O sistema electroforético baseia-se no dispositivo de KUNKEL e TISELIUS (¹¹⁴), que é constituído pelo conjunto seguinte: dois vasos que contêm o electrólito (tinas de «Pyrex» de $1, \times 27 \times 5,5$ cm), em cada um dos quais está colocado um eléctrodo de grafite pura com chumbo platinado ($20 \times 2,5 \times 0,5$ cm), e por um par de lâminas de vidro fino ($28 \times 58,5$ cm) dispostas horizontalmente sobre os vasos contendo o electrólito, lâminas essas que servem de suporte e cobertura ao papel de filtro. A electroforese foi efectuada em papel de filtro WHATMAN n.º 31, usando-se como electrólito o tampão de acetato de pH 5 (700 ml de acetato de sódio 0,2 M adicionados de 300 ml de ácido acético 0,2 M), mantendo-se a passagem de corrente por 16 horas ao potencial de 300 volts.

Para a determinação das mobilidades das substâncias separadas recorreram à fórmula

$$u = \frac{d \ l}{V \ t}$$

em que representam:

- d — a distância em cm entre o ponto de aplicação do antibiótico e o centro da *mancha*.
- l — o comprimento do papel em cm.
- V — a média das voltagens inicial e final.
- t — o tempo de migração em segundos.

Os resultados obtidos por estes Autores estão transcritos no Quadro II, não tendo sido corrigidas as mobilidades electroforéticas do efeito electrosmótico, por se ter verificado ser desprezível esse efeito com uma substância não ionizável (glicose) para o tampão e papel empregues no ensaio electroforético.

QUADRO II

Mobilidades electroforéticas da estreptomina e de outras substâncias afins, *seg.* FOSTER e ASHTON (111)

Substância	Mobilidades — $\mu \times 10^{-5}$
Estreptomina	22,5
Manosido-estreptomina	19,5
Estreptotricina	24,0
Estreptidina	24,9
Estreptamina	6,3

A revelação dos electroforegramas é feita quer por técnica microbiológica segundo o processo atrás referido de WINSTEN e EIGEN (105), quer por via química, empregando um dos seguintes reagentes de coloração:

- 1 — O reagente de diacetilo, que, actuando sobre os grupos guanidínicos, é formado pela mistura em partes iguais de uma solução aquosa de diacetilo a 0,1 por cento, de uma solução de hidróxido de potássio a 20 por cento e de uma solução alcoólica de α -naftol a 2,5 por cento.

Após pulverização e passados poucos minutos, aparece, à temperatura ambiente, uma coloração carmim brilhante se estiverem presentes, pelo menos, 5 μ g de antibiótico.

- 2 — O reagente de nafto-resorcinol, proposto por PARTRIDGE (115) para a identificação de glúcidos, é mais sensível para a estreptomina que o reagente de diacetilo.

O electroforegrama, depois de seco, é pulverizado com o reagente (0,5 g de nafto-resorcinol dissolvido em 225 ml de etanol e acidificado com 25 ml de ácido ortofosfórico concentrado) e, em seguida, colocado na estufa por 1 a 2 minutos, até que a coloração de fundo seja fracamente rosada. As *manchas* correspondentes à

estreptomicina e à di-hidro-estreptomicina são levemente vermelhas para concentrações da ordem dos 20 μg . No entanto, a reacção torna-se muito sensível para os sais de estreptomicina, cujas *manchas* são fluorescentes à luz ultravioleta, podendo revelar-se como limite inferior, quantidades compreendidas entre 1 e 5 μg . Os derivados da di-hidro-estreptomicina não são fluorescentes, mas absorvem no ultravioleta, pelo que poderão ser também identificados em baixas concentrações.

- 3 — Finalmente, referem-se ao processo de coloração baseado na conhecida reacção de ELSON e MORGAN ⁽⁹⁰⁾: o electroforegrama, depois de seco, é pulverizado com solução A (5 ml de solução alcoólica de hidróxido de potássio a 50 por cento são misturados no momento do emprego com 100 ml de acetil-acetona a 1 por cento em *n*-butanol) e aquecido na estufa a 100° por 5 minutos. Após arrefecimento, é de novo borrifado com solução B (0,5 g de *p*-dimetil-amino-benzaldeído dissolvido na quantidade mínima de etanol, acidificado com 15 ml de ácido clorídrico concentrado e ao qual se juntam 90 ml de *n*-butanol). Formam-se *manchas* róseas depois de aquecimento a 100°, por 2 minutos. Este reagente actua na porção da molécula correspondente à N-metil-glucosamina, sendo o menos sensível dos reagentes descritos por FOSTER e ASHTON.

GULOTTE ⁽¹¹⁶⁾, aplicando a técnica electroforética destes Autores, localiza, em proteínogramas, a manósido-estreptomicina, a di-hidro-estreptomicina e a estreptomicina. Emprega a revelação microbiológica em presença da estirpe de *B. subtilis* 216 e, paralelamente, a revelação química pelo reagente de nafto-resorcinol [técnica de PARTRIDGE ⁽¹¹⁵⁾].

Num outro trabalho publicado no mesmo ano (1957), PHILIPPE e *col.* ⁽¹¹⁷⁾ identificaram e dosearam a estreptidina, na estreptomicina e na di-hidro-estreptomicina. Separam por electroforese em papel quantidades da ordem dos microgramas, sendo o método mesmo aplicável a soluções contendo produtos estabilizantes.

Os electroforegramas foram obtidos em câmaras «Shandon» possuindo eléctrodos de grafite e, capazes de receber simultaneamente sete tiras de papel WHATMAN n.º 3MM de 37 cm de comprimento por 1 cm de largura. Como electrólito empregaram tampão de borato de *pH* 9 (*). A sua revelação foi realizada pelo reagente descrito por MONASTERO ⁽⁸⁰⁾ no método analítico que

(*)	Borato de sódio	7	g
	Ácido bórico	1,25	g
	Cloreto de sódio	0,3	g
	Água destilada	1000	ml

propós para a estreptomocina e di-hidro-estreptomocina. O reagente é obtido pela mistura em partes iguais de uma solução aquosa de nitrato de sódio a 10^o%, de solução aquosa de ferricianeto de potássio a 10^o% e de solução de hidróxido de sódio a 10^o%. A solução obtida deve ser empregue só depois da viragem para amarelo, corando as *manchas* dos antibióticos de vermelho.

CASTEL e *col.* (118), num estudo preliminar sobre a análise das associações de antibióticos de origem criptogâmica, descreveram pormenorizadamente um processo geral de separação por electroforese em papel e de revelação de cada antibiótico por método químico.

Utilizaram o aparelho de electroforese de MACHEBOEUF e REBEYROT, sendo as separações electroforéticas executadas em papel Arches n.º 301, com o electrólito preconizado por BISERTE (119) (*). A duração óptima da electroforese foi de 6 horas, para uma diferença de potencial de 225 *volls*. A revelação dos electroforegramas é feita por via química, tendo recorrido, para esse efeito, ao reagente de MONASTERO, que atrás referimos, ao reagente de nitrosferricianeto de sódio e a mais dois reagentes à base de anilina. O segundo reagente, proposto inicialmente por ROUX (120) para a identificação da penicilina (com a qual dá coloração azul-esverdeada) e depois modificado por SOKOLSKI e *col.* (121), é obtido do modo seguinte:

— Dissolvem-se 10 g de nitroprussiato de sódio em q. b. para 100 ml de água destilada. Alcaliniza-se com 2 ml de hidróxido de sódio a 40% e juntam-se 5 ml de um soluto aquoso de permanganato de potássio a 3%. Elimina-se o precipitado formado por filtração, conservando-se a solução obtida ao abrigo da luz. Aquela é diluída a 1/5 com água destilada, no momento do emprego. Desde que esteja presente 1 µg de antibiótico as *manchas* coram de vermelho-róseo.

A este reagente, depois de diluído, poder-se-á adicionar 2,5% de ácido acético, obtendo-se, nestas condições, uma coloração verde-amarelada.

Quanto aos reagentes que utilizam anilina, empregues, particularmente, na revelação dos glúcidos (122, 123), são pouco sen-

(*)	Piridina	6	ml
	Ácido acético cristalizado . . .	20	g
	Água destilada	1000	ml

síveis para este grupo de antibióticos, embora CASTEL e *col.* tenham indicado os seguintes:

Anilina	0,93	<i>g</i>
Anidrido ftálico	1,48	<i>g</i>
<i>n</i> -Butanol saturado de água q. b. p.	100	<i>ml</i>

Anilina	1	<i>g</i>
Ácido láctico	1	<i>g</i>
Ácido pícrico	0,025	<i>g</i>
Êter sulfúrico	100	<i>ml</i>

A coloração castanho-escuro que se forma, com qualquer destes reagentes, após aquecimento a 100° por 15 minutos, é mais acentuada para o segundo visto a coloração de fundo ser amarela-clara.

Os referidos Autores escolheram a mobilidade electroforética do sulfato de estreptomina como unidade convencional, relacionando com ela a mobilidade dos outros antibióticos. Com efeito, o deslocamento da estreptomina, nas condições experimentais descritas, é de 10 *cm* (distância contada a partir do ponto de aplicação até ao centro da *mancha*). Por outro lado, o sulfato de estreptomina migra para o cátodo no tampão de borato, como quase todos os antibióticos estudados, à excepção da penicilina G e da extencilina, cujas migrações são anódicas. A neomicina e a framicitina são os únicos que se deslocam para além do sulfato de estreptomina. No Quadro III transcrevemos as mobilidades dos diversos antibióticos estudados.

Finalmente, queremos ainda referir-nos ao recente trabalho de PARIS e THEALLET (¹²⁴) sobre a caracterização de alguns antibióticos por cromatografia e electroforese em papel. O método electroforético foi realizado em aparelho de PLEUGER de voltagem regulável, tendo os Autores utilizado electrólitos de *pH* diferentes: um constituído por solução aquosa de ácido fórmico a 5% (*pH* 2) e um outro por solução de veronal-veronal sódico a *pH* 8,6 (*).

Os resultados obtidos (Quadro IV) mostram que tanto a estrep-

(*)

Veronal	54	<i>g</i>
Veronal sódico	10,3	<i>g</i>
Água destilada q. b. p.	1000	<i>ml</i>

tomicina como a di-hidro-estreptomicina possuem idêntica mobilidade nos dois tampões.

A intensidade do campo eléctrico empregue foi de 1 mA/cm de papel (Arches 302, com as dimensões de $14 \times 40 \text{ cm}$); a tensão nos eléctrodos foi de 520 volts , tendo a electroforese sido realizada

QUADRO III

Mobilidades electroforéticas de antibióticos de origem criptogâmica, seg. CASTEL e col. (118)

Antibióticos	Mobilidades
Penicilina G	-0,38
Extencilina	-0,30
Oxitetraciclina	+0,16
Clorotetraciclina	+0,16
Tetraciclina	+0,20
Bacitracina	+0,38
Carbomicina	+0,40
Eritromicina	+0,47
Oleandomicina	+0,51
Espiramicina	+0,76
Penicilinato de quinina	+0,76
Penicilinato de procaína	+0,76
D-Cicloserina	+0,79
Viomicina	+0,91
Estreptomicina	+1,00
Di-hidro-estreptomicina	+1,00
Framicetina	+1,34
Neomicina	+1,36

durante 2 horas. Para cada ensaio, a linha de «deslocamento nulo» foi fixada por intermédio de uma substância neutra, a glicose. Os deslocamentos em milímetros foram referidos em números negativos sempre que a migração se faz em direcção ao cátodo e em números positivos quando seja em relação ao ânodo.

Todos os antibióticos foram revelados por via química, tendo recorrido para a estreptomicina e para a di-hidro-estreptomicina ao reagente proposto por Roux (120).

QUADRO IV

Mobilidades electroforéticas de vários antibióticos
seg. PARIS e THEALLET (124)

Antibióticos	Tampão de ácido fórmico	Tampão de veronal sódico
Penicilina	- 7	+ 32
Estreptomina	- 80	- 34
Di-hidro-estreptomina	- 80	- 34
Framicetina	- 130	- 40
Neomicina	- 130	- 40
Novobiocina	-	+ 35
Eritromicina	- 25	- 7
Oleandomicina	- 25	- 7
Espiramicina	- 25 e - 45	+ 5
Clorotetraciclina	- 36	+ 17
Dimetil-clorotetraciclina	- 36	+ 17
Oxitetraciclina	- 36	+ 17
Tetraciclina	- 36	+ 17
Cloranfenicol	- 5	- 3
Viomicina	- 75	- 17
Bacitracina	- 44	+ 9
Colimicina	- 85	- 10
Polimixina	- 80	- 10
Tirotricina	+ 8	+ 4
Tricomicina	25	- 3
Fungicina	13	+ 17

*

*

*

Descritos os métodos microbiológicos e físico-químicos de maior interesse para a determinação analítica da estreptomina e di-hidro-estreptomina, queremos mencionar algumas das suas mais importantes limitações, particularmente quando aplicados a misturas dos dois antibióticos.

Os métodos microbiológicos são, indiscutivelmente, os que melhor permitem apreciar a actividade antibiótica; no entanto, implicam uma técnica bastante delicada, são morosos e não proporcionam um elevado grau de precisão. Por outro lado, perante uma mistura de sais destes antibióticos, os métodos microbiológicos dão apenas a actividade total e não a de cada um dos componentes. Daí, as Farmacopeias descreverem métodos físico-químicos para a determinação da estreptomina em formas farmacêuticas contendo esses dois antibióticos.

Se bem que os métodos físico-químicos sejam de execução mais rápida e apresentem um grau de precisão maior, são, contudo, menos sensíveis que os microbiológicos, podendo mesmo determinar como antibióticos simples produtos da sua degradação. É assim que dos métodos físico-químicos referidos para a estreptomina, o considerado mais sensível, e que se baseia na dosagem do maltol pelo reagente de FOLIN e CIICALTEAU⁽⁶⁵⁾, apenas permite determinar, como limite inferior, 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina. Também para a di-hidro-estreptomina, o método de maior sensibilidade [HISCOX⁽⁷⁸⁾], só permite a dosagem de quantidades iguais ou superiores a 200 $\mu\text{g/ml}$.

Justifica-se, deste modo, a particular atenção que dedicámos à aplicação de novos métodos físico-químicos na dosagem destes antibióticos que, mantendo as características habituais de precisão e comodidade, proporcionassem uma sensibilidade comparável à dos microbiológicos. Este estudo analítico, confinou-se numa primeira parte do nosso trabalho, à aplicação do método polarográfico aos referidos antibióticos, estudo que foi executado com polarógrafos de sensibilidades diferentes, para assim se poder avaliar as possibilidades analíticas dos métodos que propomos.

Procurámos, na segunda parte da nossa contribuição pessoal, elaborar um método mais acessível para a maioria dos laboratórios e capaz de resolver cabalmente o problema da mistura de sais de estreptomina e di-hidro-estreptomina em especialidades farmacêuticas, uma vez que, em muitas circunstâncias, mesmo associando aos métodos microbiológicos os físico-químicos, se não consegue a dosagem de cada sal. Esse problema foi por nós solucionado recorrendo a uma separação prévia dos antibióticos por cromatografia ou electroforese em papel, seguida da dosagem microbiológica das respectivas *manchas*.

CONTRIBUIÇÃO PESSOAL

I PARTE

Dosagem polarográfica da estreptomina e da di-hidro-estreptomina

I — DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ESTREPTOMICINA

A existência de um grupo aldeídico na molécula da estreptomina confere a este antibiótico a possibilidade de ser reduzido no cátodo de mercúrio gotejante. Este tipo de redução polarográfica foi já, anteriormente, estudado por LEVY e col. ⁽⁹⁸⁾, BRICKER e VAIL ⁽⁹⁹⁾, HEUSER e col. ⁽¹⁰⁰⁾ e TSUKAMOTO e TACHI ⁽¹⁰¹⁾, com a finalidade principal de se obter um método de dosagem sensível e preciso, que pudesse substituir, vantajosamente, o método microbiológico, finalidade essa que não chegou a ser atingida satisfatoriamente.

O aparecimento de polarógrafos de grande sensibilidade trouxe novas perspectivas ao emprego da polarografia na dosagem deste antibiótico. Com eles nos foi possível realizar a determinação quantitativa dos sais de estreptomina por um processo preciso e de fácil execução, com sensibilidade comparável à dos métodos microbiológicos.

Antes de, pròpriamente, descrevermos o modo operatório mais conveniente para a determinação quantitativa do presente antibiótico, analisaremos o seu comportamento polarográfico em relação aos tampões de uso mais corrente, verificando-se, paralelamente, o mecanismo de redução do antibiótico.

A dosagem será feita em dois polarógrafos de sensibilidades

bastante diferentes: o polarógrafo Sargent, *modelo XXI* (*), e o polarógrafo de raios catódicos, *modelo K 1000* «Southern» (**). Com efeito, se a utilização do primeiro aparelho — aliás o de uso mais corrente — se impõe pela sua relativa acessibilidade económica, a experimentação do segundo, justifica-se pela sua notável sensibilidade, que é cerca de cem vezes superior à do polarógrafo Sargent.

Tendo em vista verificar a concordância do método proposto para a dosagem do sulfato de estreptomicina com o microbiológico, praticaremos os dois métodos sobre amostras de antibiótico padrão e em especialidades farmacêuticas. — Com idêntica finalidade, verificaremos, também, essa concordância em relação ao antibiótico que tenha sofrido uma diminuição de actividade por acção da força iónica do meio e do calor, praticando-se, paralelamente, para cada ensaio, a dosagem por método polarográfico e por método microbiológico.

Finalmente, aplicaremos o método estudado para o sulfato de estreptomicina à dosagem do pantotenato do mesmo antibiótico. Essa determinação será feita com os dois polarógrafos, indicando-se, para cada aparelho, a sensibilidade limite de dosagem e a precisão, obtidas.

A — Comportamento polarográfico e mecanismo de redução do sulfato de estreptomicina

Sempre que o hidrogênio intervém na redução catódica de compostos orgânicos, os potenciais de semi-onda ($E_{\frac{1}{2}}$) (***) dependem da força iónica da solução em que se opera a redução polarográfica. Por este motivo, há toda a vantagem em incluir a substância a analisar numa solução tampão, para que as ondas polarográficas não sofram qualquer deslocamento e se verifique uma boa reprodutibilidade da altura das curvas.

Com o fim de observarmos a influência da natureza do electrólito e o efeito produzido pela variação dos valores de pH sobre a qualidade e a intensidade da corrente de difusão das ondas polarográficas, referentes à redução da estreptomicina, realizaremos esse estudo polarográfico empregando uma série de tampões que abranjam diferentes zonas de pH .

(*) E. H. SARGENT & Co., 4647 W. Foster Ave., Chicago 30, Illinois.

(**) SOUTHERN ANALYTICAL L^{td}., Camberley Surrey, Inglaterra.

(***) O potencial de semi-onda pode ser definido como o potencial correspondente ao valor de metade da corrente de difusão.

Numa primeira fase, ensaiámos os tampões de uso mais corrente nas dosagens polarográficas e, numa segunda, uniformizámos os ensaios com o emprego de um tampão «universal».

Assim, no primeiro caso, empregámos na zona ácida uma solução de fosfato de potássio 0,2 M, cujo pH foi modificado por adição de quantidades apropriadas de ácido fosfórico a 10 % ou de solução de hidróxido de sódio de idêntica concentração, por forma a obterem-se quatro soluções com os seguintes valores de pH : 3,00, 4,30, 5,65 e 6,92. Como tampões da zona alcalina, recorreremos à solução de borato de sódio 0,2 M, preparada segundo o esquema indicado no Quadro V, para valores de pH respectiva-

QUADRO V

Composição dos tampões de borato de sódio

pH do tampão	Solução de BO_4H_3 0,2 M	Solução de $OHNa$ N/5	Água bidestilada
8,98	50 ml	22 ml	128 ml
9,40	50 ml	45 ml	105 ml
10,40	50 ml	50 ml	100 ml

mente de 8,98, 9,40, e 10,40. Para valores de pH superiores, usámos soluções de hidróxido de sódio com pH , respectivamente, de 12,20, 12,40, 12,70, 12,90 e 13,10 e solução de hidróxido de tetrametilamónio a 3 % de pH igual a 13,25.

Utilizámos nestes ensaios o polarógrafo Sargent, modelo XXI (Fig. 2) que regista directamente em papel a intensidade da corrente de difusão da onda polarográfica em função do potencial. Embora de tipo convencional, é já um polarógrafo bastante sensível, pois apresenta uma escala de sensibilidades variando entre 0,003 e 1,5 microamperes por milímetro, tendo ainda, a possibilidade de traçar curvas com uma altura máxima de 280 mm. Possui um quadrante graduado em percentagens pelo qual podemos saber, num dado momento, o valor da tensão que está a ser aplicada. Embora o período de tempo correspondente a um deslocamento completo desse quadrante seja relativamente longo (13,5 minutos), existe a possibilidade de se ajustar, manualmente,

o potencial de corrente, para os casos em que não interesse iniciar o traçado do polarograma a partir da tensão nula. Com o fim de amortecer as oscilações periódicas da corrente de electrólise, dispõe o aparelho de um interruptor de duas posições: uma para grandes amortecimentos e outra para pequenos.

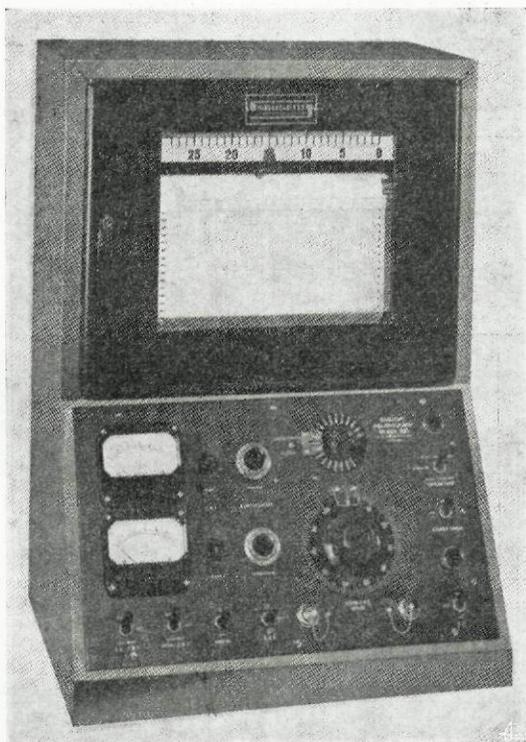


Fig. 2

Polarógrafo Sargent, *modelo XXI*

A célula polarográfica por nós empregue em todos os casos em que se trabalhou sem eléctrodo de referência, não sendo uma micro-célula, destaca-se pelo pequeno volume que comporta (3 ml) e pela sua configuração particular que permite uma perfeita desoxigenação da solução a *polarografar*.

A *figura 3* representa a célula polarográfica usada, sendo os pormenores de montagem e ligação ao circuito eléctrico indicados

na *figura 4*. Observa-se, também, nesta figura, o trajecto seguido pela corrente de azoto durante a desoxigenação, bem como os por-

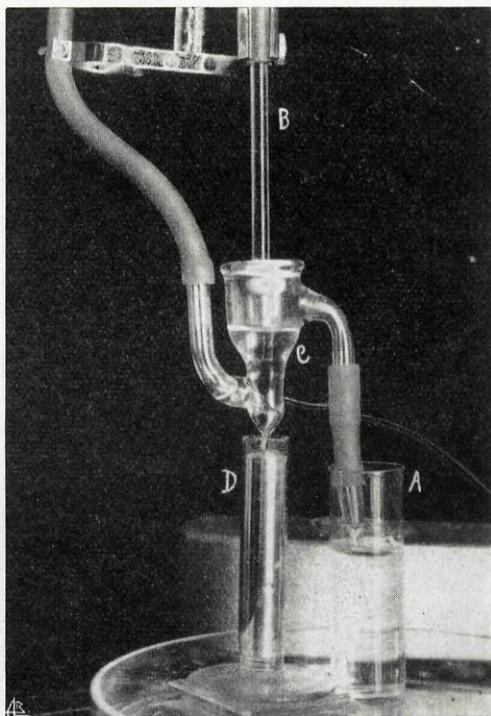


Fig. 3

Célula polarográfica

- A — Pequeno recipiente contendo água que evita a entrada de ar quando se interrompe a passagem do azoto.
- B — Capilar.
- C — Célula polarográfica.
- D — Reservatório contendo mercúrio no qual mergulha o fio de platina da célula polarográfica.

menores da ligação eléctrica da célula polarográfica, que em relação ao ânodo, é estabelecida por fio de platina fazendo contacto entre o glóbulo de mercúrio depositado no fundo da célula pola-

rográfica e um pequeno reservatório contendo mercúrio que, por sua vez, contacta elèctricamente com o polarógrafo.

Empregando os tampões atrás descritos, *polarografámos*, após

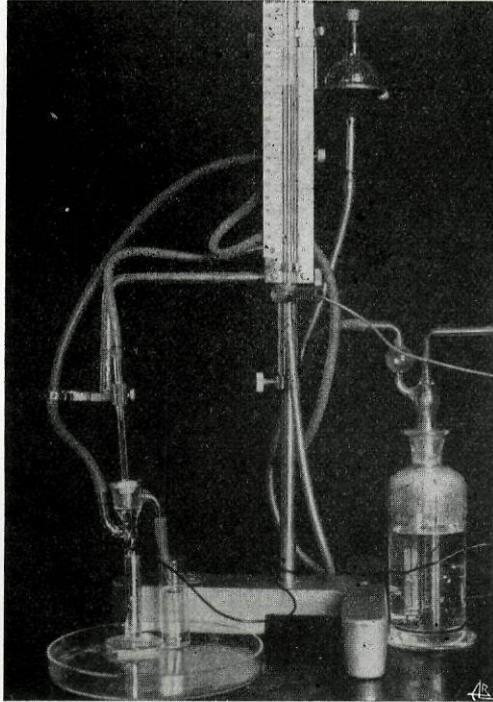


Fig. 4

Montagem e ligação elèctrica da célula polarográfica

eliminação do oxigénio (*), 3 ml de cada diluição de sulfato de estreptomicina obtida pela mistura de:

1 ml de solução de sulfato de estreptomicina 10^{-2} M
9 ml de solução tampão

(*) A eliminação do oxigénio, que se encontra dissolvido na solução, foi efectuada por borbulhamento de azoto isento de oxigénio. A purificação do azoto é conseguida por passagem deste através de tubo de «Pyrex» contendo limalha de cobre aquecida a cerca de 450° e, seguidamente, por frasco lavador contendo água, indo esta saturar o azoto e evitar qualquer modificação de volume na solução em análise.

As condições polarográficas deste ensaio foram as seguintes:

Tempo de gota (*): 3,0 *seg.*

Altura da coluna de mercúrio: 30 *cm.*

Massa do mercúrio medida em água destilada: 5,79 *mg seg⁻¹.*

Temperatura: 20°.

No Quadro VI apresentamos os resultados obtidos, indicando-se para cada tampão a escala de sensibilidade empregue e a altura da onda polarográfica em microamperes (μA).

QUADRO VI

Estudo da redução polarográfica de uma solução de sulfato de estreptomicina $10^{-3} M$, em vários tampões

Valores de <i>pH</i>	Escala de sensibilidade $\mu A / mm$	Altura das ondas polarográficas μA
Tampão de <i>fosfato</i> :		
3,00	0,030	0,75
4,30	0,030	0,85
5,65	0,030	1,53
6,92	0,030	3,27
Tampão de <i>borato</i> :		
7,90	0,030	1,62
8,95	0,030	1,71
9,40	0,030	2,04
10,40	0,030	3,53
Solução de hidróxido de sódio:		
12,20	0,080	10,24
12,40	0,080	10,35
12,70	0,080	10,72
12,80	0,080	10,65
12,90	0,080	10,30
13,10	0,080	8,67
Sol. de hidróxido de tetrametilamônio		
13,25	0,080	4,96

(*) Define-se tempo de gota como o número de segundos que medeiam entre a queda de duas gotas do tubo capilar.

Verifica-se, com este estudo, que a altura das ondas polarográficas é influenciada pela força iônica do meio, obtendo-se um aumento de sensibilidade na redução catódica do antibiótico e uma melhor reproductibilidade das ondas para os valores de pH mais elevados. No entanto, para pH superior a 12,70 a altura das ondas diminui, o que se explica por uma destruição da estreptomicina que ocorre durante a determinação polarográfica.

Queremos também assinalar que em meio alcalino aparece uma segunda onda muito menos importante que a primeira (Fig. 5)

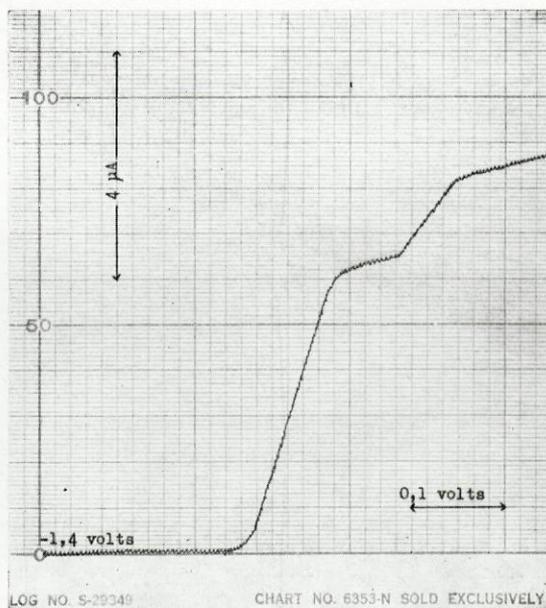


Fig. 5

Polarograma de sulfato de estreptomicina ($10^{-3}M$) obtido em electrólito-suporte de tetrametilamónio a 3% (pH 13,25), no qual se pode observar além da onda de redução principal do antibiótico, a segunda onda que se forma só em meio fortemente alcalino

Aparelho: Polarógrafo Sargent modelo XXI.

Tempo de gota: 3,0 seg.

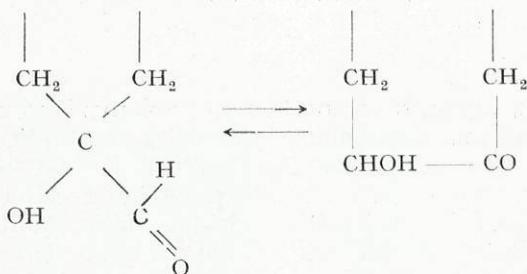
Altura da coluna de mercúrio: 30 cm.

Massa do mercúrio medida em água destilada: 5,79 mg seg⁻¹.

Temperatura: 20°.

Sensibilidade: 0,080 $\mu A/mm$.

e que, segundo BRICKER e VAIL⁽⁹⁹⁾, seria devida, provavelmente, à redução de um grupo cetônico, grupo esse que resultaria de um *re-arranjo*, do tipo que a seguir apresentamos esquematicamente,



e que sofre a estreptomomicina em meio alcalino. Só essa primeira onda polarográfica tem interesse sob o ponto de vista analítico,

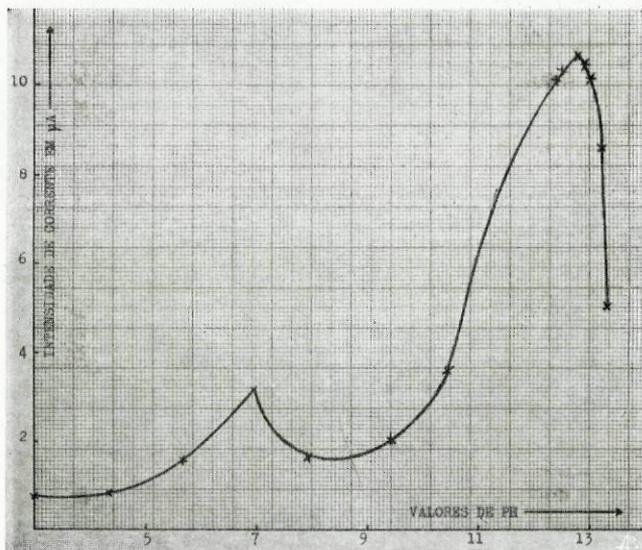


Fig. 6

Variação da corrente de difusão em função do *pH* dos tampões empregues

pois é de natureza reprodutível e tem uma maior sensibilidade. O exame da curva da *figura 6* que representa a variação da

corrente de difusão em função do pH , permite-nos verificar a existência de dois máximos, o primeiro dos quais se explica pelo emprego de um tampão de composição diferente do anterior, e o segundo, pelo facto da redução polarográfica se operar numa zona de pH muito alcalina (12,70) e haver, por isso, uma destruição apreciável do antibiótico.

Vejamos, agora, o comportamento polarográfico em presença de um tampão com uma composição básica constante.

Empregámos, pois, o tampão universal de BRITTON e ROBINSON⁽¹²⁵⁾ que é obtido pela mistura em partes iguais de soluções 0,04M de ácido bórico, ácido fenilacético e ácido fosfórico. Ajusta-se o pH em 100 ml desta mistura por meio de solução de hidróxido de sódio, completando com água bidestilada o volume de 200 ml. Para os diferentes valores de pH , as soluções tampões foram preparadas do modo seguinte:

<i>ml</i> de OHNa N/5 adicionados	10	15	20	30	32	40	60	100
pH do tampão.	2,80	3,90	5,70	7,60	8,10	10,40	12,04	12,40
<i>ml</i> de OHNa 5N adicionados	8	16	50					
pH do tampão.	12,74	13,00	13,30					

As determinações polarográficas foram efectuadas mantendo o modo operatório e as restantes condições do ensaio anterior.

O exame do Quadro VII e da *figura 7* mostra-nos que o pH óptimo para uma maior sensibilidade na redução polarográfica da estreptomicina se situa na zona alcalina (12,40 — 13,00). Assim, como no estudo anterior, podemos dizer que a altura das ondas polarográficas do sulfato de estreptomicina aumenta com o pH até ao valor de 13,00, a partir do qual, para o tampão usado, há uma destruição parcial do antibiótico.

*

*

*

Em geral, quando intervêm numa reacção de óxido-redução hidrogeniões ou hidroxiliões o potencial de semi-onda depende da força iónica do tampão usado como electrólito-suporte, verificando-se que, sempre que hidrogeniões são consumidos na redução

de uma dada substância, os potenciais de semi-onda são cada vez mais negativos, uma vez que aumentam em valor absoluto com o *pH*.

QUADRO VII

Estudo polarográfico de uma solução de sulfato de estreptomicina 10^{-3} M, com tampões preparados seg. BRITTON e ROBINSON (125)

<i>pH</i> do tampão	Escala de sensibilidade $\mu A/mm$	Altura das ondas polarográficas μA
2,80	0,010	0,09
3,90	0,010	0,15
5,78	0,010	0,28
7,60	0,010	0,71
8,10	0,010	0,86
10,40	0,030	2,10
12,04	0,030	3,36
12,40	0,030	3,90
12,74	0,030	4,17
13,00	0,030	4,31
13,30	0,030	4,26

Para uma reacção de óxido-redução com intervenção de hidrogeniões, reversível no eléctrodo gotejante e em que o número de electrões é igual ao número de hidrogeniões, pode demonstrar-se que o potencial de semi-onda é cada vez 0,059 *volts* mais negativo por cada unidade de aumento do valor de *pH* do tampão (126, 127, 128, 129). Com efeito, sempre que estamos em presença de uma reacção de óxido-redução do tipo:



o potencial de *Redox* é dado pela equação seguinte:

$$E = E_0 + \frac{0,059}{n} \log \frac{[\text{Ox}]_0}{[\text{Red}]_0} + 0,059 \frac{m}{n} \log [\text{H}_3\text{O}]^+ \quad (1)$$

em que $[Ox]_0$ e $[Red]_0$ são as concentrações de *Ox* e de *Red* junto do eléctrodo.

De acordo com as leis de FARADAY, a intensidade da corrente de electrólise é proporcional à concentração da substância *Red*. O potencial para o qual a intensidade da corrente é metade da

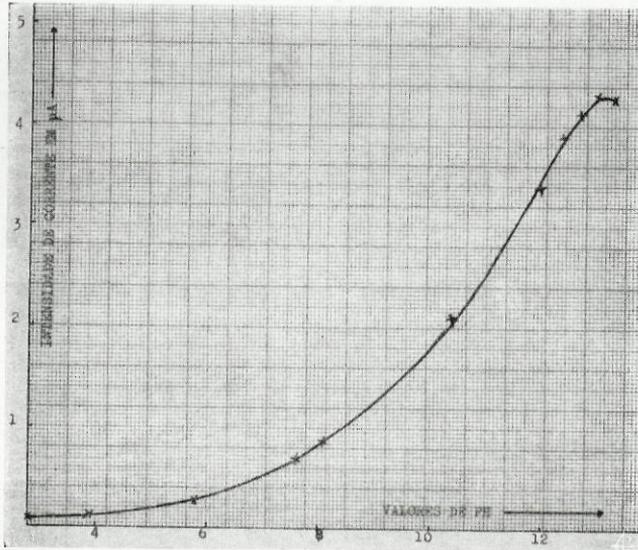


Fig. 7

Varição da corrente de difusão em função do pH dos tampões empregues de BRITTON e ROBINSON

intensidade da corrente de difusão, é, como já referimos, o potencial de semi-onda ($E_{\frac{1}{2}}$). A este potencial a substância *Ox* encontra-se reduzida a metade, pelo que a relação $\frac{[Ox]_0}{[Red]_0}$ é aproximadamente igual à unidade. Assim, simplificando a equação (1), virá:

$$E_{\frac{1}{2}} = E_0 - 0,059 \frac{m}{n} pH \quad (2)$$

ou seja:

$$E_{\frac{1}{2}} = f(0,059 pH) \quad (3)$$

Tendo em vista conhecermos os valores do potencial de semi-onda a diferentes valores de pH e com eles verificarmos se a redução polarográfica da estreptomina obedece à expressão (3), *polarografámos* soluções de estreptomina segundo as condições que a seguir descrevemos.

As determinações foram feitas em presença de eléctrodo de referência utilizando para isso a célula polarográfica de LINGANE (130) que é uma célula com eléctrodo de calomelanos saturado (Fig. 8). Esta célula contém num dos ramos a solução a *polarografar* e no outro o eléctrodo de referência (*). A ligação eléctrica entre os dois ramos da célula é assegurado por um disco de vidro poroso associado a gel de gelosa com nitrato de potássio. Na *figura 8* observa-se no ramo contendo a solução a *polarografar* os tubos F e F', que introduzimos nesta célula para permitirem a passagem da corrente de azoto que origina assim uma perfeita desoxigenação.

Para cada tampão de BRITTON-ROBINSON, cuja composição indicámos anteriormente, fizemos uma diluição da solução de sulfato de estreptomina, segundo o esquema seguinte:

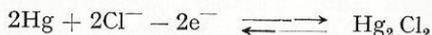
1 ml de solução de sulfato de estreptomina de concentração $5 \times 10^{-3}M$
9 ml de electrólito-suporte (tampão de BRITTON-ROBINSON)

Coloca-se no ramo direito da célula polarográfica 5 ml de cada diluição, procedendo-se à sua determinação polarográfica após borbulhamento de azoto purificado, por 10 minutos, de acordo com as seguintes condições:

Aparelho: Polarógrafo Sargent, *modelo XXI*.

Eléctrodo de referência: Eléctrodo de calomelanos saturado.

(*) É constituído por pasta de mercúrio e cloreto mercurioso em contacto com uma solução de cloreto de potássio saturada. Deste modo, a reacção que tem lugar no eléctrodo é:



Assim, o potencial de equilíbrio é dado pela equação: $E_{\text{equ.}} = E_0 - 0,059 \log [Cl^-]$ pelo que está em ligação íntima com a actividade do cloreto na solução.

Tempo de gota: 2,8 *seg.*
 Altura da coluna de mercúrio: 34 *cm.*
 Massa do mercúrio medida em água destilada: 5,79 *mg seg⁻¹.*
 Temperatura: 20°.
 Sensibilidade: 0,010 $\mu A/mm$.

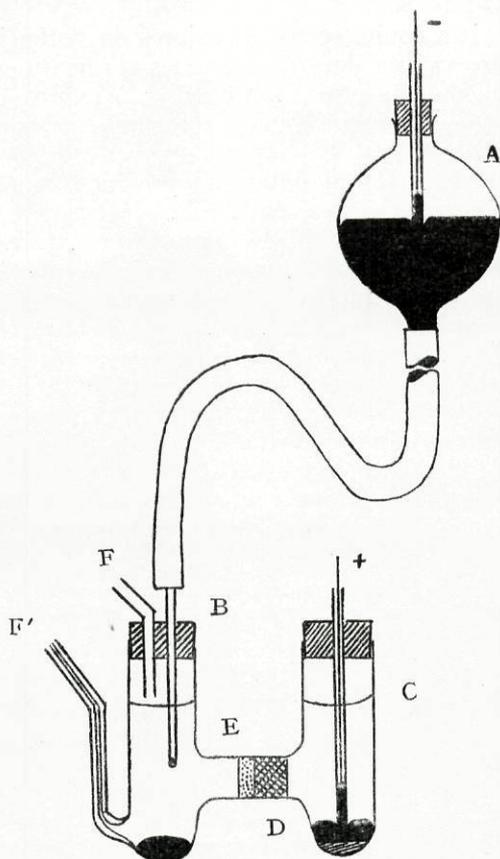


Fig. 8

Célula polarográfica, *seg.* LINGANE (130)

A — Reservatório com mercúrio ligado por tubo flexível ao capilar *B*.

C — Ramo da célula com o eléctrodo de referência e que está separado do ramo *E* por gel de gelosa (*D*).

E — Ramo da célula contendo a solução a polarografar, o qual possui dois tubos *F* e *F'* para a passagem de gás inerte.

No Quadro VIII resumimos os valores obtidos neste ensaio, e na *figura 9* damos a curva resultante da variação do potencial de semi-onda em função da força iónica do electrólito-suporte.

QUADRO VIII

Variação do potencial de semi-onda do sulfato de estreptomicina, em função do pH do electrólito-suporte

pH	$E_{\frac{1}{2}}$	ΔpH	$\Delta E_{\frac{1}{2}}$	$\Delta E_{\frac{1}{2}}/\Delta pH$	m/n (*)
3,90	1,105	—	—	—	—
4,50	1,140	0,60	0,035	0,061	1,0
5,78	1,215	1,28	0,075	0,059	1,0
7,60	1,325	1,82	0,110	0,060	1,0
8,10	1,355	0,50	0,030	0,060	1,0
10,40	1,495	2,30	0,140	0,060	1,0
12,04	1,590	1,54	0,095	0,061	1,0

ΔpH — Diferença entre o valor de pH considerado e o valor de pH anterior.

$\Delta E_{\frac{1}{2}}$ — Diferença entre o potencial de semi-onda considerado e o valor de potencial de semi-onda anterior.

Verificámos, deste modo, que entre os valores de pH 4 e 12, e uma vez que o cociente de m/n se mantém praticamente igual a 1, o número de electrões é o mesmo que o número de hidrogeniões que intervêm na reacção de óxido-redução. Assim, concluímos que o potencial de semi-onda é uma função linear do pH do electrólito e que estamos em presença de uma reacção do tipo reversível em que o número de electrões permanece constante.

(*) Tendo em conta a expressão simplificada para o cálculo do potencial de semi-onda $E_{\frac{1}{2}} = E_0 - 0,059 m/n pH$, a que atrás fizemos referência, determinou-se o valor de m/n pela equação $E_{\frac{1}{2}}' - E_{\frac{1}{2}}'' = 0,059 m/n (pH'' - pH')$.

B — Método de dosagem proposto para o sulfato de estreptomicina

Analisando os resultados obtidos no estudo do comportamento polarográfico da estreptomicina, chega-se à conclusão de que a altura das ondas respeitantes à redução do antibiótico é máxima para os valores de pH compreendidos de 12,0 a 13,0.

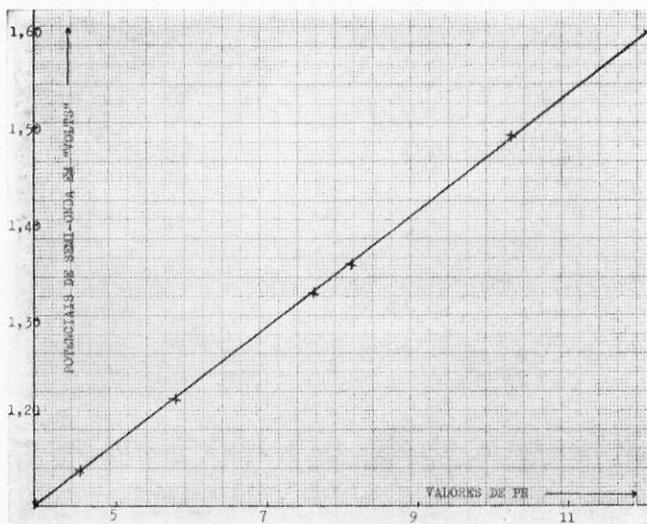


Fig. 9

Varição do potencial de semi-onda do sulfato de estreptomicina, em função do pH do electrólito-suporte

Baseando-nos nesses resultados, confrontámos as alturas das ondas polarográficas obtidas na redução do sulfato de estreptomicina em vários electrólitos ajustados a pH 12,70. Isto, porque a esse valor de pH , será nula a alteração do antibiótico, pois além da diluição que o electrólito sofre, o tempo que medeia entre a junção da solução do antibiótico ao electrólito e a sua dosagem polarográfica é relativamente curto (menos de 20 minutos).

No Quadro IX indicam-se os electrólitos empregues e as alturas, em μA , das respectivas ondas polarográficas obtidas, usando uma concentração de sulfato de estreptomicina de $10^{-3}M$ e operando segundo as condições polarográficas referidas na página 41.

Confrontando os valores das alturas inscritas nesse quadro, observa-se que o electrólito constituído por solução de cloreto de sódio 0,01 M em hidróxido de sódio N/10, é o que proporciona, na redução do antibiótico, uma maior corrente de difusão.

QUADRO IX

Redução polarográfica de uma solução de sulfato de estreptomicina, 10^{-3} M, em função do electrólito empregue

Electrólitos a <i>pH</i> 12,70 (*)	Altura das ondas polarográficas μA
Solução de borato de sódio 0,04 M	6,48
Solução de cloreto de amónio a 5% em hidróxido de amónio N/10	6,00
Solução de cloreto de sódio 0,01 M em hidróxido de sódio N/10	10,96
Solução de fosfato dissódico 0,04 M	9,60
Solução de hidróxido de sódio N/10	10,72
Solução de hidróxido de tetrametilamónio a 2%	6,24

Assim, depois de havermos verificado que a altura das ondas obtidas neste electrólito-suporte, não sofre variações apreciáveis para a mesma concentração de antibiótico, procurámos estabelecer, para o polarógrafo Sargent XXI e para o polarógrafo de raios catódicos, uma *curva-padrão* que incluísse a concentração mínima doseável deste antibiótico. Apresentaremos, também, em relação às duas *curvas-padrões*, um estudo estatístico destinado a mostrar a precisão e reprodutibilidade do método de dosagem que propomos, cuja descrição detalhada será feita seguidamente.

(*) Os electrólitos foram ajustados a *pH* 12,70 com ácido clorídrico a 10% ou com solução de hidróxido de sódio de idêntica concentração.

1 — Dosagem em polarógrafo Sargent, modelo XXI

Modo operatório:

Colocámos na célula polarográfica 3 ml de cada uma das soluções preparadas do seguinte modo:

- 1 ml de solução de sulfato de estreptomicina de concentração apropriada (728,7 $\mu\text{g/ml}$ a 1457,4 $\mu\text{g/ml}$)
- 9 ml de electrólito-suporte — cloreto de sódio 0,01 M em solução de hidróxido de sódio N/10 ($\text{pH}=12,70$).

Depois de termos feito passar, durante 10 minutos, uma corrente de azoto purificado, procedemos à determinação polarográfica nas condições seguintes:

Tempo de gota: 2,8 seg.
Altura da coluna de mercúrio: 34 cm.
Massa do mercúrio medida em água destilada: 5,77 mg seg^{-1} .
Temperatura: 19°.
Sensibilidade: 0,010 $\mu\text{A/mm}$.

Resultados:

A qualidade das ondas polarográficas é muito satisfatória e as suas alturas facilmente mensuráveis, sendo estas determinadas de acordo com o processo indicado no polarograma representado na *figura 10*.

O valor do potencial de semi-onda medido em relação ao eléctrodo de calomelanos saturado é de -1,36 volts para a onda polarográfica principal.

No Quadro X indicamos as concentrações do antibiótico empregues e as alturas das ondas polarográficas obtidas. Esses valores serviram-nos para traçar a *curva-padrão* do sulfato de estreptomicina (Fig. 11) a qual nos mostra ser a altura das ondas uma função linear da concentração do antibiótico.

Sensibilidade limite e precisão:

A determinação do antibiótico neste polarógrafo, segundo a técnica descrita, permite uma sensibilidade limite de dosagem de 72,87 $\mu\text{g/ml}$.

O estudo estatístico, cujos resultados estão inscritos no Quadro XI, deu-nos a conhecer a precisão e reprodutibilidade do

processo de dosagem. O método estudado, embora mais preciso que o método microbiológico, tem uma sensibilidade bastante inferior. Esta desvantagem não traduz qualquer inconveniente,

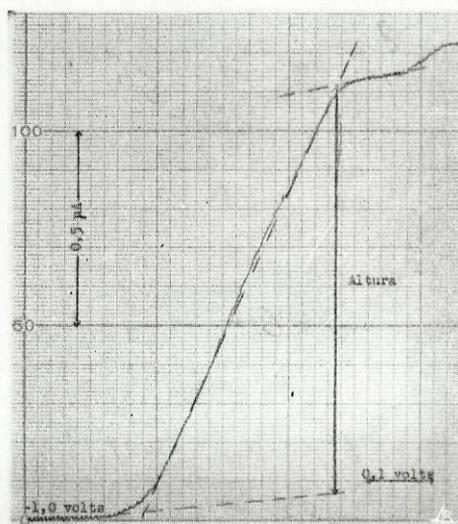


Fig. 10

Polarograma obtido em polarógrafo Sargent XXI para uma concentração de sulfato de estreptomicina de 131,20 $\mu\text{g/ml}$

uma vez que as especialidades farmacêuticas contendo sulfato de estreptomicina apresentam este antibiótico sempre em concentração elevada.

2— Dosagem em polarógrafo de raios catódicos

O polarógrafo de raios catódicos, embora obedecendo aos princípios clássicos da polarografia, destaca-se dos aparelhos correntes pela sua maior sensibilidade e precisão.

Foi RANGLES^(131, 132) o primeiro investigador a descrever as modificações básicas que conduziram ao seu aparecimento; no entanto, foram, sem dúvida, os trabalhos de DAVIS e SEA-

QUADRO X

Resultados que nos permitiram o traçado da *curva-padrão* do sulfato de estreptomicina com polarógrafo Sargent XXI

Concentrações <i>μg/ml</i>	Alturas das ondas polarográficas <i>μA</i>	K (*) <i>mg/l, μA</i>
72,87	0,54	—
87,44	0,66	121
102,02	0,79	117
116,59	0,91	118
131,20	1,03	119
145,74	1,16	118

BORN⁽¹³³⁾ que vieram permitir a comercialização, há bem poucos anos, deste tipo de polarógrafo pela *Southern Analytical Ltd.*

Utilizámos, neste trabalho, o *modelo K1000* desta firma, cujo aspecto exterior pode ser observado na *figura 12*.

A grande sensibilidade deste polarógrafo, resulta, em parte, da existência de uma lâmpada de raios catódicos em substituição do habitual sistema inscridor mecânico, pelo que no painel dessa lâmpada serão traçadas as curvas polarográficas à custa de sinal luminoso cujo deslocamento está, portanto, condicionado pela corrente desenvolvida na célula polarográfica.

Como vantagens do polarógrafo catódico, em relação aos polarógrafos convencionais, queremos apontar as seguintes:

Sensibilidade — É cerca de 100 vezes mais sensível que os polarógrafos ordinários. Na escala correspondente à sensibilidade de 2×10^{-8} *amperes* ainda permite a dosagem de substâncias em quantidade da ordem dos decimigramas por mililitro, com elevado grau de precisão.

Poder de resolução — Pode dosear na mesma solução iões cujos potenciais de semi-onda se encontrem afastados de, pelo menos,

(*) — O valor de K é o cociente entre a concentração em *mg/l* e a altura da onda polarográfica em *μA*, tomando como zero a concentração e a altura da onda mais baixa.

0,100 volts. No circuito derivativo este poder de resolução é ainda aumentado.

Rapidez— Os polarogramas são obtidos em tempos inferiores a 7 segundos.

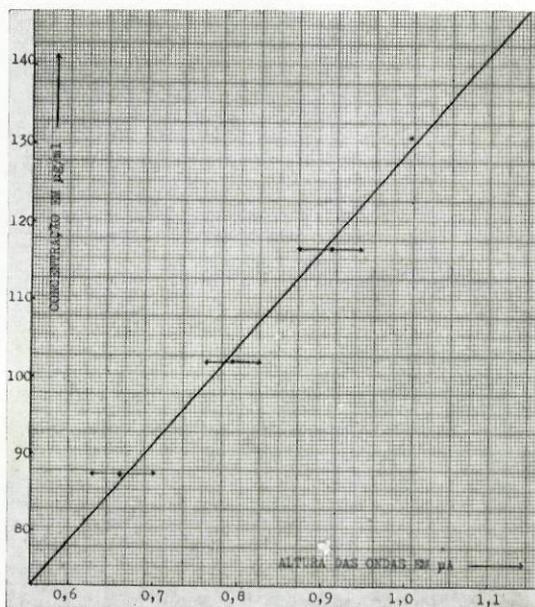


Fig. 11

Curva-padrão do sulfato de estreptomicina empregando polarógrafo Sargent XXI

Facilidade de manejo— Uma vez regulado o tempo de gota para um valor tal que o sinal catódico se encontre em boas condições no painel da lâmpada de raios catódicos (cerca de 7 segundos) não temos mais do que fotografar o polarograma obtido. Essa fotografia pode depois ser ampliada para melhor se poder apreciar.

A *figura 13* mostra dois polarogramas obtidos neste polarógrafo e que nos serviram para o traçado da *curva-padrão* do sulfato de estreptomicina.

Modo operatório:

As soluções do antibiótico a submeter à dosagem polarográfica são diluídas a 1/10 no electrólito aconselhado (cloreto de sódio 0,01 M em solução de hidróxido de sódio N/10) ficando com

QUADRO XI

Estudo estatístico da dosagem do sulfato de estreptomicina empregando polarógrafo Sargent XXI

Tomada de ensaio do antibiótico $\mu\text{g/ml}$	Altura das ondas polarográficas $m\mu\text{A}$	Média das alturas das ondas pol. $m\mu\text{A}$	Erro padrão da média (s_m)	Limite de confiança a 95 % $t = 2,3$	Limite relativo (*) $\mu\text{g/ml}$
87,44	640 - 660 - 640 - 680 650 - 650 - 660 - 680 - 680 - 670 -	661	15,9	36,57	$87,44 \pm 4,83$
102,02	820 - 800 - 810 - 810 790 - 770 - 800 - 810 - 800 - 820 -	803	14,9	34,27	$102,02 \pm 4,35$
116,59	930 - 910 - 920 - 890 880 - 890 - 900 - 910 - 910 - 920 -	906	15,8	36,34	$116,59 \pm 4,67$

as concentrações finais apresentadas no Quadro XII. Introduzem-se 3 ml de cada diluição na célula polarográfica fazendo-se passar durante 10 minutos, uma corrente de azoto purificado, e

(*) O valor do afastamento indicado no limite relativo foi determinado por regra de três simples. Para isso, relacionou-se a concentração da tomada de ensaio com a média das alturas das ondas polarográficas, calculando-se o pretendido valor do afastamento, em $\mu\text{g/ml}$, em relação ao limite de confiança expresso na mesma unidade que a média das alturas das ondas polarográficas.

submetendo-se, em seguida, à dosagem polarográfica nas condições seguintes:

Tempo de gota (*): $\approx 6,5$ seg.

Altura da coluna de mercúrio: 21,7 cm.

Massa do mercúrio medida em água destilada: 3,34 mg seg⁻¹.

Temperatura: 20°.

Factor de escala: 0,04.

Potencial no início: - 1,1 volts.

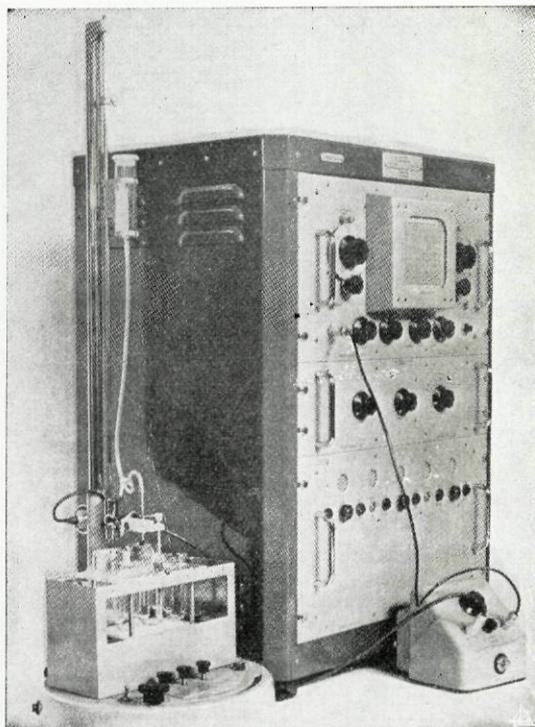


Fig. 12

Polarógrafo de raios catódicos, *modelo K 1000* «Southern», associado ao suporte da coluna de mercúrio e unidade conversora anódica

(*) Deve ser ajustado por forma que o espaço de tempo entre a queda de duas gotas fique sincronizado com o deslocamento do sinal catódico.

Resultados:

No Quadro XII indicamos as concentrações de sulfato de estreptomicina e as alturas das ondas polarográficas, em μA ,

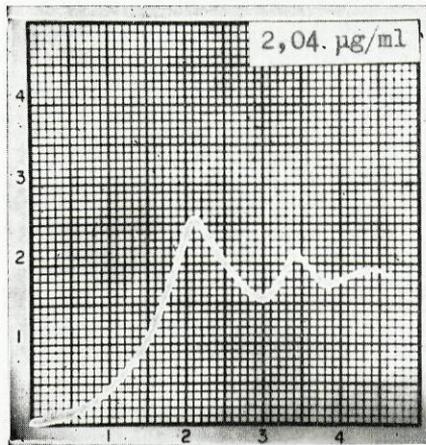
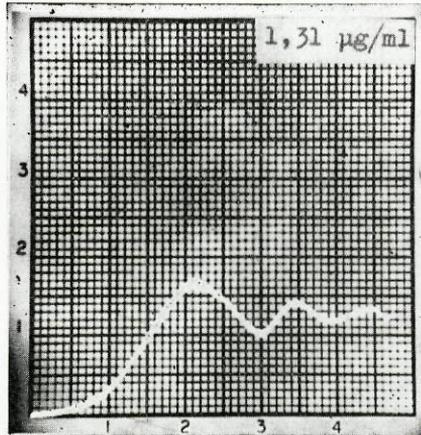


Fig. 13

Polarogramas obtidos no polarógrafo de raios catódicos para o sulfato de estreptomicina em concentrações, respectivamente, de 1,31 $\mu g/ml$ e de 2,04 $\mu g/ml$

valores estes, que nos serviram para o traçado da *curva-padrão* (Fig. 14).

Com o fim de conhecermos a precisão da dosagem polarográfica do sulfato de estreptomicina neste polarógrafo, fizemos um estudo estatístico com três concentrações intermédias da *curva-padrão*. Os resultados obtidos, que fazem parte do Quadro XIII,

QUADRO XII

Valores que nos permitiram o traçado da *curva-padrão* do sulfato de estreptomicina com polarógrafo de raios catódicos

Concentrações $\mu\text{g/ml}$	Altura das ondas polarográficas μA	K $\text{mg}^2/\mu\text{A}$
0,58	0,029	—
1,31	0,066	19
2,04	0,102	20
2,77	0,140	19
3,50	0,176	19

demonstram a precisão do método de dosagem proposto. Assim, verificamos que neste polarógrafo o método tem uma sensibilidade limite de dosagem semelhante à dos métodos microbiológicos (0,58 $\mu\text{g/ml}$), mas com um erro inferior (5%).

C—Estudo comparativo dos métodos polarográfico e microbiológico na dosagem do sulfato de estreptomicina

Pelo presente estudo quisemos verificar a concordância do método microbiológico com o polarográfico proposto para a dosagem do sulfato de estreptomicina, praticando-se os dois métodos em especialidades farmacêuticas contendo este antibiótico. Para isso, indicaremos em primeiro lugar a técnica seguida para a dosagem microbiológica do sulfato de estreptomicina, e, em seguida, a

composição das especialidades farmacêuticas estudadas bem como os resultados obtidos com as dosagens executadas pelo método polarográfico e microbiológico.

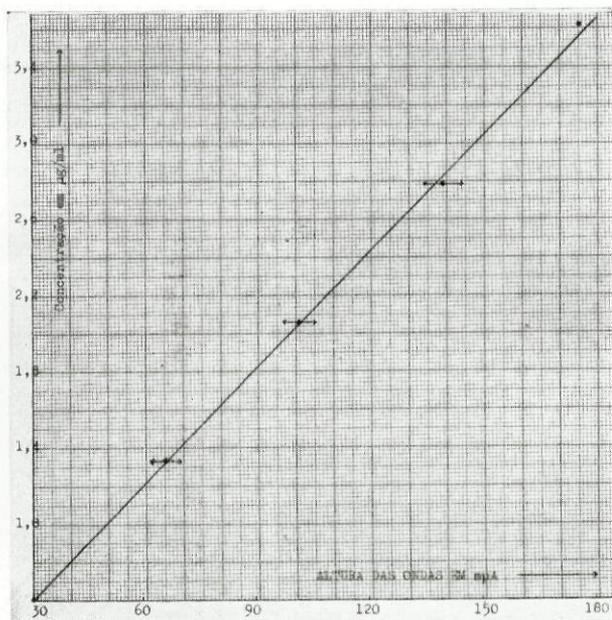


Fig. 14

Curva-padrão do sulfato de estreptomicina obtida com o polarógrafo de raios catódicos

1 — Método microbiológico utilizado

a) Material empregue e descrição do método

Cilindros:

Usámos cilindros de aço com um diâmetro externo de 8 mm ($\pm 0,1$ mm), um diâmetro interno de 6 mm ($\pm 0,1$ mm) e uma altura de 10 mm ($\pm 0,1$ mm), que foram esterilizados em estufa a 150° por 2 horas.

Placas de Petri:

Caixas de vidro, de fundo plano, de cerca de 20 mm de altura por 100 mm de diâmetro.

QUADRO XIII

Estudo estatístico da dosagem do sulfato de estreptomicina empregando o polarógrafo de raios catódicos

Tomada de ensaio do antibiótico $\mu g/ml$	Altura das ondas polarográficas $m\mu A$	Média das alturas das ondas pol. $m\mu A$	Erro padrão da média (s_m)	Limite de confiança a 95 % $t = 2,3$	Limite relativo $\mu g/ml$
1,31	64 - 66 - 66 68 - 64 - 68 - 64 68 - 66 - 66	66,0	1,6	3,68	$1,31 \pm 0,07$
2,04	102 - 104 - 100 102 - 106 - 102 - 104 100 - 100 - 102	102,2	1,9	4,37	$2,04 \pm 0,08$
2,77	140 - 140 - 142 144 - 138 - 136 - 142 140 - 138 - 138	139,8	2,3	5,29	$2,77 \pm 0,10$

Meios de cultura:

Para obter a cultura do microorganismo e como camada inferior a dispor nas placas de *Petri*, empregámos o meio n.º 1 com a seguinte composição:

Peptona	6	g
Digesto pancreático de caseína	3	g
Extracto de carne	1,5	g
Gelosa	15	g
Água destilada q. b. p.	1000	ml

O *pH* é ajustado entre 7,8 e 8,0 após a esterilização.

O microorganismo foi mantido no meio n.º 2, com a composição que a seguir indicamos:

Peptona	6	g
Digesto pancreático de caseína	4	g
Extracto de levedura	3	g
Extracto de carne	1,5	g
Glicose	1	g
Gelosa	15	g
Água destilada q. b. p.	1000	ml

O *pH* é ajustado entre 6,5 e 6,6 após a esterilização.

Preparação da solução do padrão:

Trabalhámos com padrão fornecido pela *U. S. P. Reference Standard* (*), que uma vez aberto deve ser mantido sob vácuo em virtude de ser higroscópico. A solução padrão foi obtida pela dissolução de quantidade conveniente de antibiótico em tampão de *fosfato* a *pH* 6, estéril (**), de modo a ficar na concentração de 1000 μ g de estreptomicina-base por mililitro. Esta solução é estável quando mantida à temperatura de 15º ou inferior, por tempo não superior a 30 dias.

Preparação da solução da amostra:

Partimos de especialidades farmacêuticas contendo sulfato de estreptomicina, das quais pesámos quantidades convenientes que foram dissolvidas em tampão de *fosfato* a *pH* 6, de modo a ficarem numa concentração de cerca de 1000 μ g de estreptomicina-base por mililitro.

Preparação da suspensão bacteriana:

Começámos por obter uma suspensão de esporos de *Bacillus subtilis* A. T. C. C. 6633 (***), fazendo desenvolver o microor-

(*) *U. S. P. Reference Standard*, 46 Park Avenue, New York 16.

(**) Composição do tampão de *fosfato* de *pH* 6:

Fosfato monopotássico	8	g
Fosfato dipotássico	2	g
Água destilada estéril q. b. p.	1000	ml

(***) *American Type Culture Collection*, 2029 M Street, N. W. Washington, D. C.

ganismo teste, pelo tempo de uma semana, à temperatura de 37°, em frascos de ROUX contendo o meio de cultura n.º 2. Suspendemos os esporos em água destilada estéril e aquecemos por 30 minutos a 65°. Lavámos esta suspensão de esporos, por três vezes, com água destilada estéril, aquecendo novamente a 65° por 30 minutos. Finalmente, suspendemos os esporos em água destilada a 15° e determinámos com esta suspensão a quantidade a adicionar a cada 100 ml do meio n.º 1 (normalmente 0,5 a 1,0 ml) de modo a obtermos zonas de inibição convenientes.

Preparação das placas:

Juntámos 21 ml do meio de cultura n.º 1, fundido, a cada caixa de *Petri*. Distribuímos convenientemente e deixámos arrefecer em superfície horizontal. A cada placa adicionámos, em seguida, 4 ml do mesmo meio de cultura, no qual se incorporou a suspensão de esporos. Distribuímos uniformemente e deixámos arrefecer. Sobre esta superfície colocámos seis cilindros espaçados de 60 graus num raio de 2,8 cm.

Obtenção da curva-padrão:

Diluímos a solução padrão em tampão de *fosfato* de pH 8 (*) de modo a prepararem-se soluções contendo, respectivamente, 0,6-0,7-0,8-0,9-1,0-1,1-1,2-1,3-1,4-1,5 µg/ml. Usámos um total de 27 placas para se obter a *curva-padrão*: três placas para cada solução, excepto para a de 1,0 µg/ml que, sendo a concentração correspondente ao ponto de referência, é incluída em cada placa. As placas são incubadas por 16 a 18 horas a 37°, medindo-se depois os diâmetros das zonas de inibição correspondentes a cada uma das concentrações. Tomando em ordenadas as concentrações e em abcissas o diâmetro corrigido (**) das zonas de

(*) Composição do tampão de *fosfato* de pH 8:

Fosfato dipotássico	16,730 g
Fosfato monopotássico	0,523 g
Água destilada estéril q. b. p.	1000 ml

(**) Em cada grupo de três placas determinam-se as médias dos diâmetros correspondentes a cada uma das concentrações. Calcula-se a média de todos os valores respeitantes à concentração mediana e em relação a esta média corrigem-se os números encontrados para as diferentes concentrações conforme a seguir é indicado. Assim, se a média geral dos diâmetros da

inibição, traçámos a *curva-padrão* em papel semi-logarítmico (Quadro XIV e *figura 15*).

QUADRO XIV

Valores que nos serviram para a construção da *curva-padrão* do sulfato de estreptomicina por método microbiológico

Concentrações <i>µg/ml</i>	Valor do diâmetro das zonas de inibição depois de corrigido <i>mm</i>
0,6	14,6
0,7	17,8
0,8	20,0
0,9	21,8
1,0	23,1
1,1	24,0
1,2	25,0
1,3	25,6
1,4	26,3
1,5	26,8

Dosagem pròpriamente dita:

Para determinarmos a actividade antibiótica da amostra a dosear, preparam-se as soluções desta e do padrão na concentração mediana (1,0 *µg/ml*), distribuindo-se alternadamente cada uma delas em três cilindros de cada placa de um grupo de três placas. Medidos os diâmetros de cada zona de inibição, depois de incubação na estufa, calcula-se a média dos valores encontrados para o padrão e para a amostra em ensaio.

Corrigida a média dos diâmetros das zonas de inibição da

concentração média for M (em *mm*) e a média dos diâmetros da mesma concentração num dado grupo for M_1 , a média dos diâmetros corrigidos (M_2) do referido grupo, será dada pela seguinte expressão:

$$M_2 \text{ (corrigido)} = M_2 + (M - M_1)$$

amostra em relação ao valor que serviu para o traçado da *curva-padrão*, calcula-se a concentração da amostra por leitura directa nessa curva.

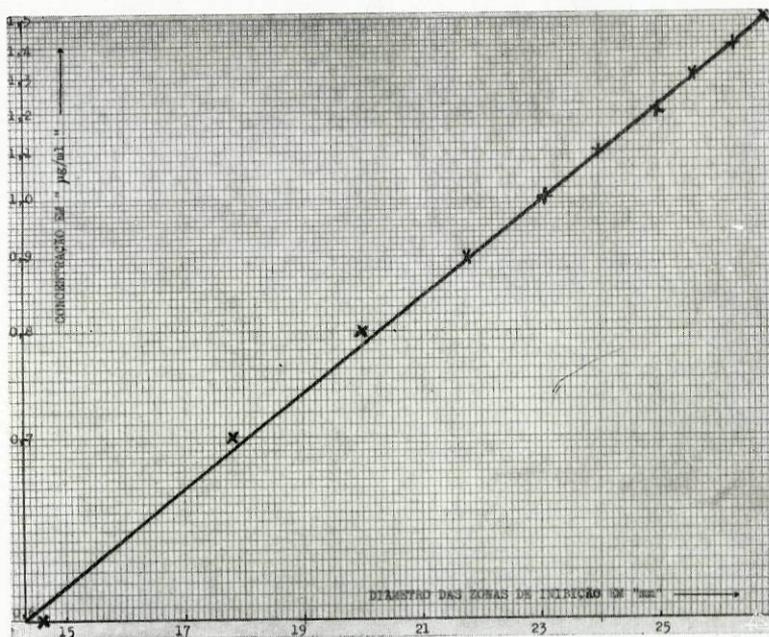


Fig. 15

Curva-padrão do sulfato de estreptomicina
por método microbiológico

2 — Confronto entre os métodos polarográfico e microbiológico

Uma vez traçada a *curva-padrão*, praticámos, paralelamente, o método polarográfico e o microbiológico em especialidades farmacêuticas contendo sulfato de estreptomicina.

Especialidades farmacêuticas em estudo (*):

Streptomycine DIAMANT (**)

(*) Especialidades farmacêuticas adquiridas na Suíça.

(**) Laboratórios *Diamant S. A.* — Société des Antibiotiques de France, 63 Boul. Hausseman — Paris.

COMPOSIÇÃO:

Frasco contendo 1 grama de estreptomicina-base sob a forma de sulfato.

Streptomycin sulfate MERCK (*)

COMPOSIÇÃO:

Frasco contendo 5 gramas de estreptomicina-base sob a forma de sulfato.

Streptomycin Novo (**)

COMPOSIÇÃO:

Frasco contendo 5 gramas de estreptomicina-base, sob a forma de sulfato, dissolvidos em 20 ml de solução aquosa tamponada e adicionada de substâncias conservadoras.

Dosagem polarográfica

A dosagem polarográfica foi executada pela técnica que atrás descrevemos, em polarógrafo de raios catódicos e também em polarógrafo Sargent XXI, empregando o método dos padrões internos, para o que juntámos uma quantidade de antibiótico padrão correspondente a 20 por cento da concentração provável da amostra.

Nos Quadros XV e XVI indicam-se os resultados obtidos na dosagem polarográfica das três especialidades, para cada tipo de polarógrafo, exprimindo-se o grau de pureza, em relação ao sulfato de estreptomicina padrão, em percentagem de actividade.

Dosagem microbiológica

A dosagem microbiológica foi executada nestas mesmas especialidades, de acordo com o método que referimos ao iniciar o presente estudo. Os valores analíticos obtidos são indicados no Quadro XVII, mencionando-se para cada especialidade a actividade do antibiótico, em percentagem de pureza.

Discussão e conclusões

Confrontando os dois métodos de dosagem através dos estudos estatísticos cujos resultados transcrevemos nos Quadros XV, XVI

(*) Laboratórios *Merck & Co.* — U. S. A.

(**) Laboratórios *Novo* — Copenhague, Dinamarca.

e XVII, torna-se evidente a concordância do método polarográfico com o microbiológico, e também a sua óptima precisão e reprodutibilidade.

QUADRO XV

Estudo estatístico da dosagem polarográfica do sulfato de estreptomicina em especialidades farmacêuticas, com o polarógrafo de raios catódicos

Especialidades farmacêuticas	Actividade do antibiótico em percentagem	Média aritmética (m)	Erro padrão da média (s _m)	Limite relativo em percentagem de actividade $t = 2,3$
<i>Streptomycine</i> DIAMANT	98,05 - 99,86 - 100,08 99,54 - 98,98 - 100,10 99,80 - 99,88 - 99,94 - 99,57 -	99,58	0,64	99,58 ± 1,47
<i>Streptomycin sulfate</i> MERCK	99,87 - 100,86 - 100,50 99,90 - 100,85 - 101,30 99,54 - 100,74 - 100,06 - 99,32 -	100,29	0,66	100,29 ± 1,52
<i>Streptomycin</i> Novo	99,96 - 101,21 - 100,87 99,68 - 100,24 - 101,70 101,08 - 100,69 - 100,03 - 100,75 -	100,62	0,63	100,62 ± 1,45

D—Ensaio de estabilidade do sulfato de estreptomicina

Estes ensaios tiveram por finalidade verificar as possibilidades da dosagem polarográfica do sulfato de estreptomicina, nos casos em que o antibiótico tenha sofrido uma diminuição de actividade por acção de um meio com *pH* desfavorável ou do calor. Neste sentido, a dosagem do antibiótico foi praticada, simultaneamente, pelo método polarográfico proposto e pelo microbiológico (*).

(*) Em todos estes estudos de estabilidade os resultados analíticos obtidos, por qualquer dos dois métodos, foram sempre expressos pelo valor médio respeitante a cinco dosagens distintas.

QUADRO XVI

Estudo estatístico da dosagem polarográfica do sulfato de estreptomicina em especialidades farmacêuticas, com o polarógrafo Sargent XXI

Especialidades farmacêuticas	Actividade do antibiótico em percentagem	Média aritmética (m)	Erro padrão da média (s _m)	Limite relativo em percentagem de actividade t = 2,3
<i>Streptomycine</i> DIAMANT	97,08 - 98,76 - 101,20 97,90 - 99,75 - 100,60 99,60 - 99,87 - 100,10 - 100,02 -	99,49	1,24	99,49 ± 2,85
<i>Streptomycin sulfate</i> MERCK	97,70 - 99,51 - 101,84 97,75 - 99,50 - 100,56 98,48 - 100,29 - 102,34 - 102,10 -	100,07	1,64	100,07 ± 3,77
<i>Streptomycin</i> NOVO	99,90 - 99,42 - 102,30 99,86 - 100,98 - 100,14 98,50 - 101,40 - 100,30 - 100,15 -	100,30	1,06	100,30 ± 3,52

QUADRO XVII

Estudo estatístico da dosagem microbiológica do sulfato de estreptomicina em especialidades farmacêuticas

Especialidades farmacêuticas	Actividade do antibiótico em percentagem	Média aritmética (m)	Erro padrão da média (s _m)	Limite relativo em percentagem de actividade t = 2,3
<i>Streptomycine</i> DIAMANT	94,24 - 94,26 - 98,37 96,73 - 106,65 - 88,88 99,70 - 105,09 - 101,13 - 100,63 -	98,57	5,31	98,57 ± 12,22
<i>Streptomycin sulfate</i> MERCK	98,70 - 102,04 - 103,85 98,60 - 100,05 - 111,20 97,40 - 101,53 - 89,11 - 101,82 -	100,43	7,09	100,43 ± 16,30
<i>Streptomycin</i> NOVO	99,25 - 110,35 - 104,27 104,32 - 100,76 - 105,24 100,69 - 103,44 - 94,08 - 100,17 -	102,26	5,79	102,26 ± 13,31

Recorremos, para todos os ensaios, ao polarógrafo de raios catódicos, que além de mais preciso e sensível, permite realizar a dosagem num período de tempo menor que o exigido pelo polarógrafo Sargent. Também, em todos estes estudos de estabilidade, se praticou a dosagem polarográfica do sulfato de estreptomicina, empregando-se como padrão interno, 20 por cento da concentração provável de antibiótico presente nas amostras a dosar.

1 — Estudo de estabilidade do sulfato de estreptomicina em solução de hidróxido de sódio decinormal

Com este estudo quisemos verificar não só a concordância entre o método polarográfico proposto e o microbiológico, como também a diminuição de actividade que o sulfato de estreptomicina possa sofrer em solução de hidróxido de sódio, uma vez que na dosagem polarográfica propusemos um electrólito-suporte contendo hidróxido de sódio decinormal.

Modo operativo:

Para a obtenção da curva de estabilidade, preparámos uma solução de sulfato de estreptomicina na concentração de $79,8 \mu\text{g/ml}$ em hidróxido de sódio decinormal, sendo essa solução submetida à dosagem polarográfica a intervalos de tempos variáveis.

Paralelamente, com a dosagem polarográfica, praticámos a determinação por método microbiológico, depois de havermos neutralizado a solução alcalina do antibiótico.

No Quadro XVIII indicamos as concentrações de sulfato de estreptomicina determinadas e os períodos de tempo que mediarão entre a obtenção da solução e a sua dosagem pelos dois métodos. Esses valores permitiram-nos o traçado das curvas de estabilidade *A* e *B*, indicadas na *figura 16*.

Conclusões:

O confronto das curvas de estabilidade *A* e *B* representadas na *figura 16* demonstram a concordância dos resultados obtidos com os dois métodos de dosagem do antibiótico.

Podemos também verificar que, em solução de hidróxido de sódio decinormal, o sulfato de estreptomicina sofre, 19 horas após a obtenção dessa solução, uma decomposição de cerca de 60 por cento da quantidade inicialmente presente, não havendo prática-

mente modificação da actividade do antibiótico durante a primeira hora, o que tem uma grande importância para o método analítico proposto.

QUADRO XVIII

Variação da concentração do sulfato de estreptomicina em função do tempo que medeia entre a obtenção da solução em $\text{OHNa N}/10$ e a sua dosagem por método polarográfico e microbiológico

Tempo em horas	Concentrações determinadas por método polarográfico $\mu\text{g/ml}$	Concentrações determinadas por método microbiológico $\mu\text{g/ml}$
—	79,8	79,8
1/2	79,8	79,8
1	79,4	79,0
2	77,7	76,4
4	72,7	74,0
8	64,0	60,8
12	51,6	56,1
19	31,6	35,3

2 — Estudo de estabilidade do sulfato de estreptomicina em solução de hidróxido de sódio normal

Na execução deste estudo, usámos condições operatórias idênticas e a mesma concentração de antibiótico do ensaio de estabilidade precedente.

Os valores analíticos obtidos com a dosagem polarográfica e microbiológica estão escritos no Quadro XIX, tendo estes servido para o traçado das curvas de estabilidade *A* e *B* da *figura 17*.

Conclusões:

A observação das curvas de estabilidade da *figura 17* confirma uma perda maior de actividade do sulfato de estreptomi-

cina em presença de hidróxido de sódio normal. Como no estudo anterior, mantém-se a concordância do método polarográfico com

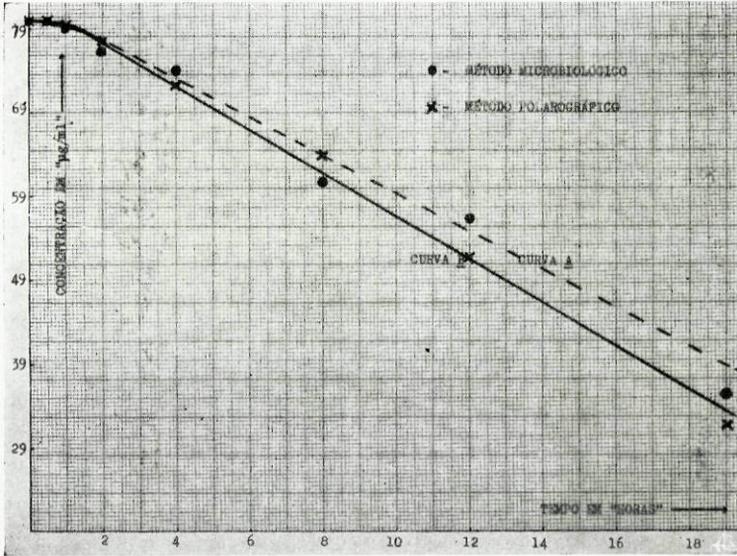


Fig. 16

Curvas de estabilidade do sulfato de estreptomicina em solução de hidróxido de sódio decinormal

Curva A — Curva obtida por método microbiológico
Curva B — Curva obtida por método polarográfico

o microbiológico, mesmo para os casos em que a molécula da estreptomicina sofreu degradação por efeito de um meio fortemente alcalino.

3 — Estudo da estabilidade de uma solução de sulfato de estreptomicina à acção do calor

Encheu-se uma série de ampolas de 5 ml de capacidade com solução de sulfato de estreptomicina em água bidestilada na concentração de 79,8 µg/ml, sendo o seu fecho realizado em atmosfera de azoto. Em seguida, submeteram-se lotes de três ampolas a

QUADRO XIX

Varição da concentração do sulfato de estreptomicina em função do tempo que medeia entre a obtenção da solução em OHNa N/1 e a sua dosagem por método polarográfico e microbiológico

Tempo em horas	Concentrações determinadas por método polarográfico <i>µg/ml</i>	Concentrações determinadas por método microbiológico <i>µg/ml</i>
—	79,8	79,8
1/2	79,4	79,0
1	77,8	77,0
6	60,3	57,2
10	45,3	49,0
14	25,5	25,7
18 ½	10,4	21,6

diferentes tempos de aquecimento a b. a., segundo o esquema referido no Quadro XX, procedendo-se em cada lote à dosagem do antibiótico por método polarográfico e microbiológico, de acordo com o modo operatório usado nos ensaios de estabilidade precedentes.

Conclusões:

De harmonia com os resultados analíticos expressos no Quadro XX, traçamos as curvas de estabilidade em função do tempo de aquecimento a b. a. para os dois métodos de dosagem (Fig. 18).

Pudemos verificar, pelo pequeno afastamento das curvas, a óptima concordância dos resultados e, por conseguinte, a validade do método polarográfico proposto, mesmo nos casos em que a estreptomicina, em solução, tenha sofrido alteração por efeito de aquecimento.

E — Aplicação do método polarográfico à dosagem do pantotenato de estreptomicina

Diferindo o pantotenato do sulfato de estreptomicina apenas na natureza do ácido que salifica o antibiótico, é evidente que o método polarográfico proposto para o primeiro sal será igualmente aplicável na determinação do segundo, não permitindo, por isso, a dosagem diferencial destes sais. O mesmo

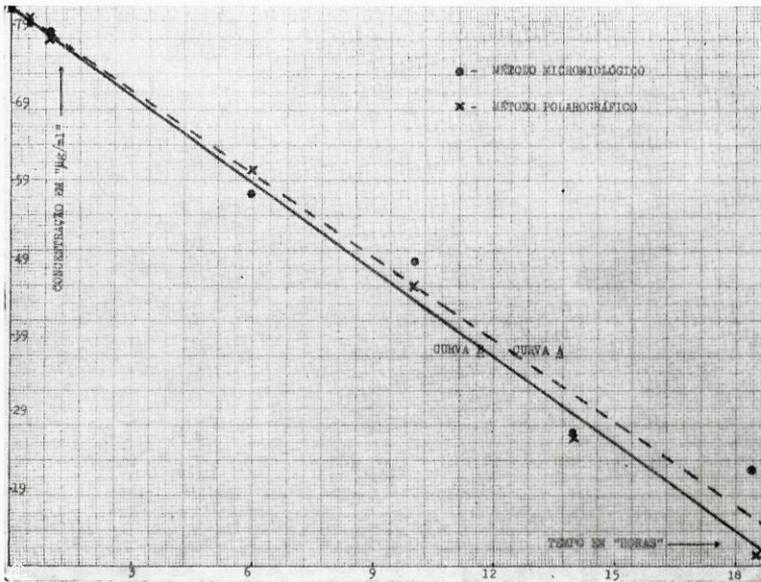


Fig. 17

Curvas de estabilidade do sulfato de estreptomicina em solução de hidróxido de sódio normal

Curva A — Curva obtida por método microbiológico

Curva B — Curva obtida por método polarográfico

não sucederia se a redução polarográfica incidisse sobre o anião pantotenato, facto este perfeitamente exequível com o emprego de determinados electrólitos. Sendo o ácido pantoténico só reduzível a potenciais bastante negativos, não podem os elec-

trólitos de suporte conter sais de metais alcalinos, para assim se inibir a interferência devida à onda do hidrogénio. LINGANE e DAVIS (134) verificaram ser possível a redução polarográfica do ácido pantoténico em presença de outras vitaminas do complexo B, utilizando como electrólito-suporte, solução de brometo de tetrametilamónio 0,1 M.

QUADRO XX

Variação da concentração do sulfato de estreptomicina em função do tempo de aquecimento a b.a.

Tempo em minutos	Concentrações determinadas por método polarográfico <i>µg/ml</i>	Concentrações determinadas por método microbiológico <i>µg/ml</i>
—	79,8	79,8
25	73,8	74,8
54	67,8	69,1
81	63,5	55,1
115	55,7	56,0
136	52,0	50,3
160	45,0	39,6

O emprego desta técnica com o polarógrafo Sargent XXI e o polarógrafo de raios catódicos, não conduziu a resultados satisfatórios na dosagem do ácido pantoténico, pois as ondas polarográficas são mal definidas, o que torna difícil a determinação das suas alturas.

Tendo em vista a obtenção de um electrólito de suporte mais conveniente para a dosagem do ácido pantoténico, experimentámos a solução de cloreto de lítio 0,05 M, alcalinizada a *pH* 10 com hidróxido de lítio decinormal. Verificámos que neste suporte as ondas polarográficas apresentam uma melhor individualização, tendo-se obtido, como potencial de semi-onda, medido em relação ao eléctrodo de referência de calomelanos saturado, o valor -1,95 volts.

Executada a dosagem desta substância em polarógrafo de raios catódicos, verificamos a possibilidade de dosear, como limite inferior, o valor de $24,8 \mu\text{g/ml}$, o que corresponde a uma concentração molar de cerca de 2×10^{-5} .

Estudada a técnica de dosagem do ácido pantoténico, aplicamo-la à dosagem do pantotenato de estreptomicina. No entanto,

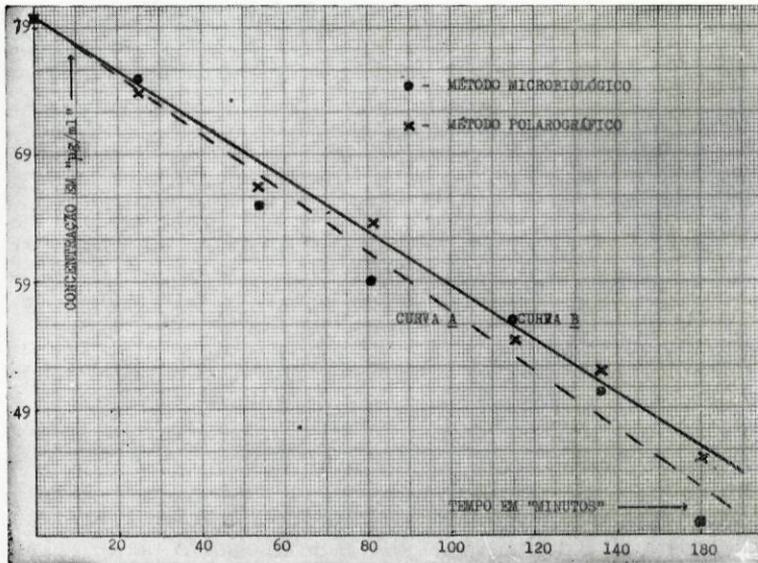


Fig. 18

Decomposição do sulfato de estreptomicina em função do tempo de aquecimento a b. a.

Curva A — Curva obtida por método microbiológico

Curva B — Curva obtida por método polarográfico

dada a grande diferença entre os pesos moleculares do ácido pantoténico e da estreptomicina, a redução polarográfica do anião referente ao pantotenato de estreptomicina, só é possível para concentrações deste sal já de certo modo elevadas. Com efeito, operando com polarógrafo Sargent, a concentração mais baixa doseável é de 10^{-2} M, enquanto que com polarógrafo de raios catódicos, o limite inferior é de 10^{-4} M. Em face destes resultados a dosagem polarográfica do pantotenato de estreptomicina, baseada na redução do anião pantotenato, tem pouco interesse analítico.

*

*

*

Como era de esperar, a dosagem polarográfica do pantotenato de estreptomicina à custa da redução do grupo aldeídico da estreptomicina, mostrou-se vantajosa na determinação deste antibiótico. Essa dosagem, que a seguir descrevemos, foi executada, como habitualmente, nos dois polarógrafos que temos vindo a utilizar, apresentando-se para cada um dos aparelhos, uma *curva-padrão* que inclui as concentrações mínimas doseáveis; indicamos, ainda, o erro padrão da média e o limite de confiança do método.

1 — Dosagem do pantotenato de estreptomicina com polarógrafo Sargent XXI

Antes de procedermos à dosagem própria dita, estudámos o comportamento polarográfico do pantotenato de estreptomicina que se verificou ser semelhante ao do sulfato de estreptomicina. Utilizando como electrólito de suporte a solução de cloreto de sódio 0,01 M em hidróxido de sódio decinormal, obtêm-se ondas polarográficas reproduzíveis cujas alturas são facilmente determináveis (Fig. 19). Também, como para o caso do sulfato de estreptomicina, a redução passa-se com a formação de duas ondas, sendo a primeira a que tem interesse sob o ponto de vista analítico. Em relação a essa onda o potencial de semi-onda, medido em presença do eléctrodo de calomelanos saturado, é de $-1,33$ volts.

Modo operativo:

A dosagem é feita segundo a técnica usada na determinação do sulfato de estreptomicina, e descrita na página 46.

Tendo em vista o estabelecimento de uma *curva-padrão*, empregámos soluções de pantotenato de estreptomicina de concentrações compreendidas entre $619,7 \mu\text{g/ml}$ e $1115,4 \mu\text{g/ml}$ que, de igual modo, foram diluídas a $1/10$ em solução de cloreto de sódio 0,01 M em hidróxido de sódio decinormal, sendo a determinação polarográfica de cada solução executada nas seguintes condições:

Tempo de gota: 2,5 seg.

Altura da coluna de mercúrio: 2,5 cm.

Massa do mercúrio medida em água destilada: 2,60 mg seg^{-1} .
 Temperatura: 19°.
 Sensibilidade: 0,010 $\mu A/mm$.

Resultados:

No Quadro XXI, indicamos as concentrações do antibiótico usadas e os correspondentes valores das alturas das ondas polarográficas, em μA . Com estes valores construímos a *curva-padrão* (Fig. 20).

QUADRO XXI

Valores empregues no traçado da *curva-padrão* do pantotenato de estreptomicina com polarógrafo Sargent XXI

Concentrações $\mu g/ml$	Altura das ondas polarográficas μA	K $\mu g \mu A$
61,97	0,49	—
74,36	0,58	137
86,75	0,68	130
99,14	0,78	128
111,54	0,87	130

Sensibilidade limite e precisão:

A sensibilidade limite de dosagem para o pantotenato de estreptomicina é de 61,97 $\mu g/ml$. Um estudo estatístico (Quadro XXII) executado sobre três concentrações, correspondentes a pontos médios da *curva-padrão* deste antibiótico, demonstrou possuir a dosagem boa precisão e reprodutibilidade.

2 — Dosagem do pantotenato de estreptomicina empregando o polarógrafo de raios catódicos modelo K 1000

Com o fim de conhecermos também a quantidade mínima de antibiótico doseável ao ser utilizado o polarógrafo de raios catódicos, fomos, mantendo a técnica descrita para a sua dosagem no polarógrafo Sargent, obter uma *curva-padrão*.

Condições polarográficas:

Tempo de gota: $\approx 6,5$ seg.

Altura da coluna de mercúrio: 22 cm.

Massa do mercúrio medida em água destilada: 3,10 mg seg⁻¹.

Temperatura: 20°.

Factor de escala: 0,025.

Potencial no início: -1,35 volts.

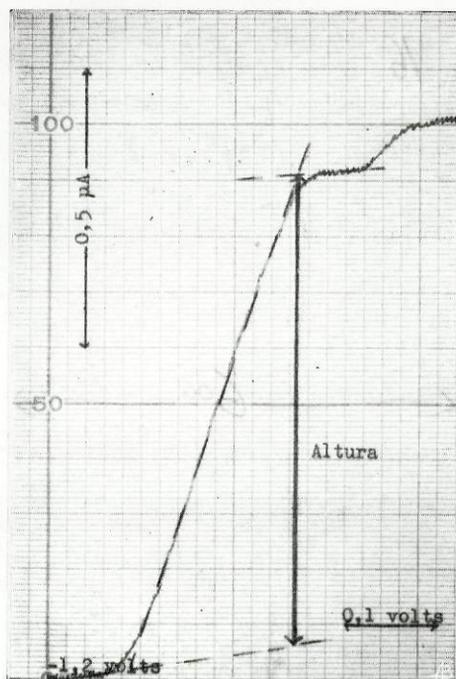


Fig. 19

Polarograma obtido em polarógrafo Sargent XXI, para uma concentração de pantotenato de estreptomicina de 99,14 $\mu\text{g/ml}$

Na figura 21 reproduzimos dois polarogramas obtidos para concentrações de pantotenato de estreptomicina, respectivamente, de 1,73 $\mu\text{g/ml}$ e de 3,22 $\mu\text{g/ml}$.

A *curva-padrão* (Fig. 22) que engloba a quantidade mínima de antibiótico doseável, foi traçada de acordo com os valores inscritos no Quadro XXIII referentes aos resultados da dosagem.

Sensibilidade limite e precisão:

A quantidade mínima de pantotenato de estreptomicina doseável neste polarógrafo é de $0,99 \mu\text{g/ml}$. Se confrontarmos este resultado com a quantidade mínima obtida na dosagem do

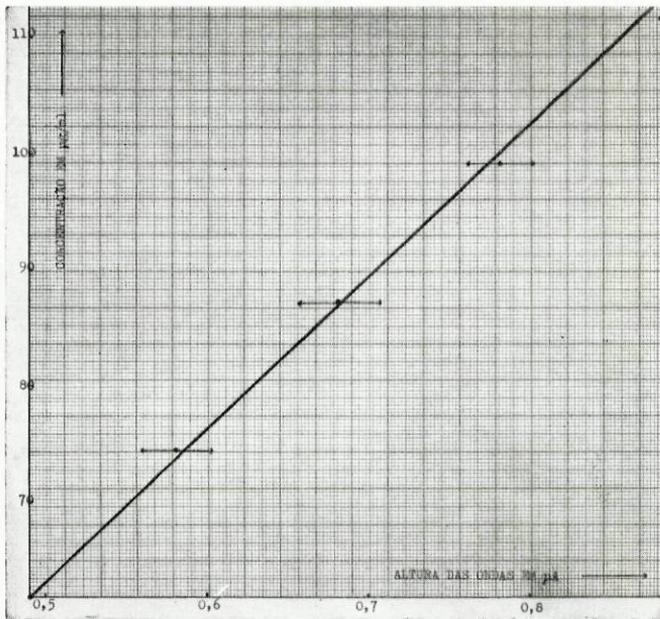


Fig. 20

Curva-padrão do pantotenato de estreptomicina obtida com polarógrafo Sargent, modelo XXI

sulfato de estreptomicina no mesmo polarógrafo (pág. 53), verificamos ser o método mais sensível para este antibiótico.

Como para o sulfato, obtém-se uma boa precisão e reprodutibilidade, o que é demonstrado pelos resultados de um estudo estatístico executado sobre três concentrações intermédias da *curva-padrão*, cujos valores se encontram inscritos no Quadro XXIV.

QUADRO XXII

Estudo estatístico da dosagem do pantotenato de estreptomicina empregando polarógrafo Sargent, *modelo XXI*

Tomada de ensaio do antibiótico $\mu\text{g/ml}$	Altura das ondas polarográficas $m\mu\text{A}$	Média das alturas das ondas pol. $m\mu\text{A}$	Erro padrão da média (s_m)	Limite de confiança a 95% $t = 2,3$	Limite relativo $\mu\text{g/ml}$
74,36	580 - 570 - 600 - 600 590 - 580 - 580 - 570 - 570 - 580 -	582	11,3	25,99	$74,36 \pm 3,26$
86,75	660 - 660 - 670 - 680 680 - 680 - 690 - 690 - 690 - 690 -	679	11,9	27,37	$86,75 \pm 3,49$
99,14	770 - 780 - 780 - 780 790 - 800 - 770 - 780 - 770 - 780 -	780	9,4	21,62	$99,14 \pm 2,74$

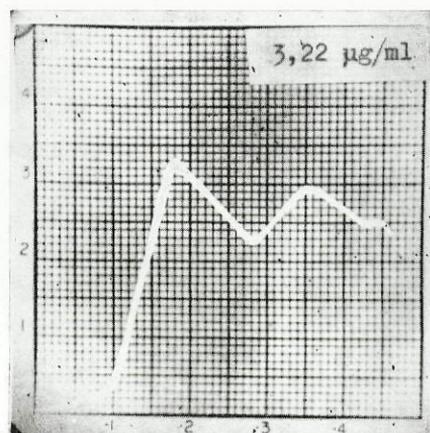
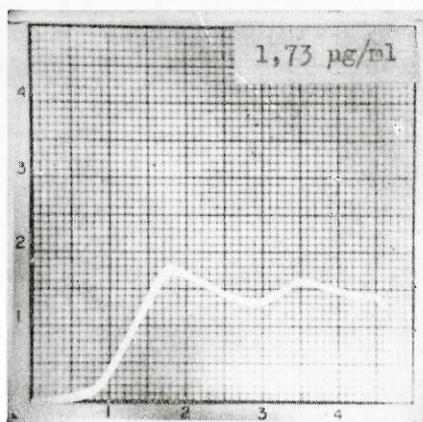


Fig. 21

Polarogramas obtidos no polarógrafo de raios catódicos com o pantotenato de estreptomicina para concentrações, respectivamente, de 1,73 $\mu\text{g/ml}$ e de 3,22 $\mu\text{g/ml}$

QUADRO XXIII

Valores utilizados no traçado da *curva-padrão* do pantotenato de estreptomicina com polarógrafo de raios catódicos

Concentrações $\mu\text{g/ml}$	Altura das ondas polarográficas $\text{m}\mu\text{A}$	K $\text{mg}/\mu\text{A}$
0,99	38	—
1,73	70	23
2,48	100	24
3,22	130	24
3,97	162	24

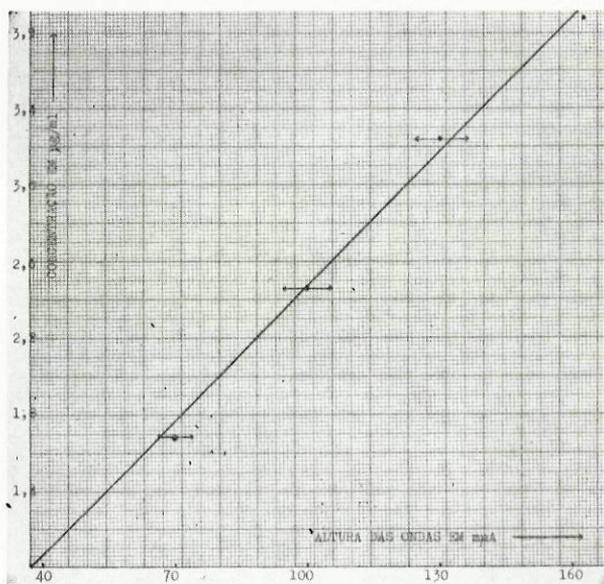


Fig. 22

Curva-padrão do pantotenato de estreptomicina obtida com polarógrafo de raios catódicos

QUADRO XXIV

Estudo estatístico da dosagem do pantotenato de estreptomicina
empregando polarógrafo de raios catódicos

Tomada de ensaio do antibiótico $\mu\text{g/ml}$	Altura das ondas polarográficas $m\mu\text{A}$	Média das alturas das ondas pol. $m\mu\text{A}$	Erro padrão da média (s_m)	Limite de confiança a 95 % $t = 2,3$	Limite relativo $\mu\text{g/ml}$
1,73	70 - 72 - 70 - 68 70 - 70 - 66 - 70 72 - 70	69,8	1,7	3,91	$1,73 \pm 0,09$
2,48	100 - 100 - 102 - 102 100 - 96 - 100 - 104 96 - 100	100,0	2,4	5,52	$2,48 \pm 0,13$
3,22	130 - 126 - 132 - 130 134 - 134 - 130 - 130 128 - 130	130,4	2,7	6,21	$3,22 \pm 0,15$

II — DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA DI-HIDRO-ESTREPTOMICINA

Encontrando-se o grupo aldeídico livre da estreptomicina, substituído por um radical alcoólico na molécula da di-hidro-estreptomicina, é evidente que o método polarográfico proposto para a dosagem do primeiro antibiótico, baseado, precisamente, na redução daquele grupo, não será aplicável na determinação da di-hidro-estreptomicina. Por isso, visando o emprego do método polarográfico, estudámos dois métodos analíticos que apresentando uma sensibilidade comparável aos métodos microbiológicos pudessem oferecer maior comodidade e precisão.

Assim para a di-hidro-estreptomicina propomos dois métodos polarográficos, um directo e outro indirecto. O primeiro, fundamenta-se na propriedade que este antibiótico tem de diminuir a altura do máximo da onda polarográfica do cloreto de cobalto. O segundo método consiste na dosagem do formaldeído libertado na oxidação da di-hidro-estreptomicina pelo metaperiodato de sódio.

A — Determinação do sulfato de di-hidro-estreptomicina pelo método da diminuição do máximo da onda polarográfica do cobalto

Antes de pròpriamente indicarmos a técnica seguida na dosagem do sulfato de di-hidro-estreptomicina por este método, iremos, em linhas gerais, descrever os tipos mais correntes de máximos polarográficos, suas características e seu interesse analítico, uma vez que o método que propomos se fundamenta no comportamento destes máximos.

Na redução polarográfica de algumas substâncias e sempre que se mantenham determinadas condições, ao aumentar gradualmente a tensão aplicada aos eléctrodos, observa-se que, logo que é atingido o potencial de separação, a intensidade cresce muito bruscamente, decrescendo logo em seguida, para alcançar o valor correspondente à corrente de difusão. A curva apresenta, assim,

uma elevação muito acentuada, logo seguida de um declínio, (Fig. 23), aspecto que é designado correntemente por «máximo».

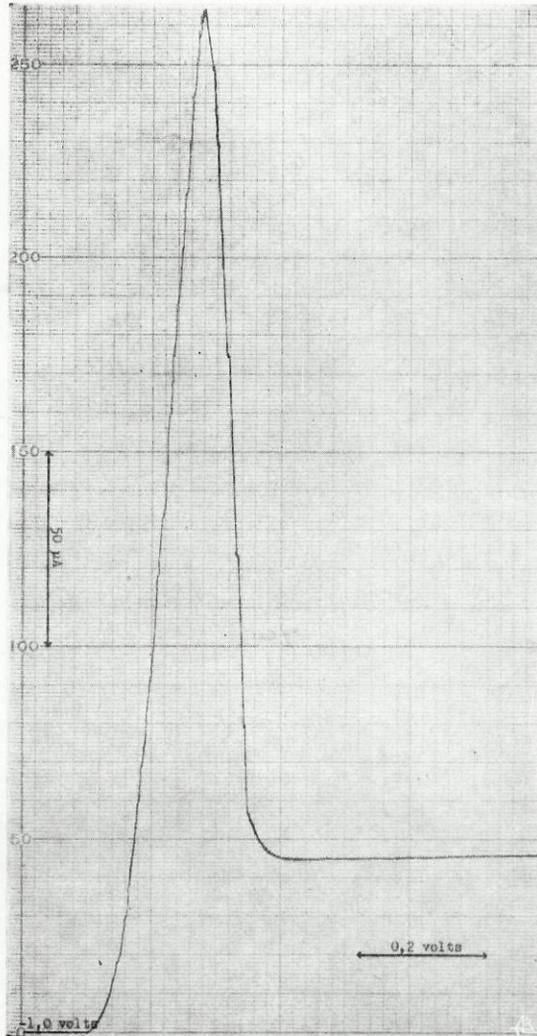


Fig. 23

Onda de redução do cobalto em solução amoniacal, mostrando um máximo polarográfico típico

A existência destas ondas com máximos seria devida ao facto da quantidade de substância que atinge o eléctrodo ser superior à que chegaria por uma difusão normal. Verifica-se na região em volta do eléctrodo gotejante, o aparecimento de correntes que se dirigem para este contendo uma concentração dessa substância superior à normal. Estas correntes anormais são explicadas por fenómenos de adsorção e pela existência de um campo eléctrico não homogéneo na zona que circunda o eléctrodo gotejante (135). A propósito, deve referir-se que a presença de substâncias tensioactivas, adsorvíveis na interfase mercúrio-solução pode reduzir a altura desses máximos ou mesmo evitar a sua formação, o que depende da concentração existente na solução a *polarografar*.

O aparecimento de máximos nas ondas polarográficas pode ser encarado sob dois aspectos: — o máximo ser indesejável por interferir na dosagem de um dado componente, ou ser-nos útil, quando o máximo nos interessa para fins analíticos.

No primeiro caso, temos de o eliminar por junção de quantidades convenientes de substância tensioactiva, de elevado peso molecular, ou mesmo de corantes, que fazendo desaparecer o máximo não interfiram na altura da onda polarográfica em estudo. Como exemplo de substâncias usadas com este fim citamos o laurilsulfato de sódio, «Triton X100», gelatina, metilcelulose, vermelho de metilo, supressores estes, que actuam em concentrações muito baixas (10^{-6} a 10^{-8} M).

O segundo caso interessa-nos sempre que se pretenda dosear polarograficamente substâncias supressoras de máximos, mesmo que estas não sejam electro-redutíveis. Para isso temos que escolher as concentrações que originam uma maior proporcionalidade na diminuição da altura dos máximos. Constrói-se, nessa zona, uma *curva-padrão* e, sempre que possível, faz-se a dosagem por comparação com amostras de teor conhecido.

Encontram-se na literatura numerosas referências à diminuição da altura dos máximos polarográficos, com fins analíticos, por intermédio de agentes supressores, que resumidamente iremos focar:

Sulfamidas:

O ácido p-aminobenzóico e alguns dos seus derivados de acção sulfamídica não apresentam qualquer onda catódica ou anódica em HCl 0,1 N ou em KCl 0,1 N. No entanto, à custa do efeito inibidor sobre o máximo da onda do oxigénio estabeleceu-se a concordância entre a dosagem microbiológica e o grau de actividade tensioactiva de diferentes sulfonamidas (136, 137).

Hexacloroexano :

Dos isómeros do hexacloroexano, o isómero γ é o insecticida de maior actividade e também, o produto que apresenta um efeito supressor mais acentuado sobre o máximo da onda do oxigénio (138).

Ésteres do ácido p-hidroxibenzóico :

A actividade supressora dos ésteres do ácido *p*-hidroxibenzóico concorda com a sua actividade biológica, sendo, no trabalho de GHIGI e CAPPELINA (139) estudados os ésteres metílico, etílico e propílico.

Colesterol :

TALAFANT (140) determinou o colesterol no soro sanguíneo, precipitando-o por uma solução cetónica de digitonina, e doseando o excesso desta à custa da sua acção supressora sobre o máximo que a onda polarográfica do cobalto apresenta em meio amoniacal.

Barbitúricos :

ZUMAN (141) estudou as condições de dosagem de vários derivados do ácido sulfobarbitúrico, recorrendo à acção supressora sobre o máximo da onda do oxigénio.

Diferenciação entre produtos naturais e sintéticos :

Tendo-se verificado que as substâncias de origem natural estão normalmente acompanhadas de compostos tensioactivos que não se encontram nos produtos sintéticos, é possível por este método diferenciar os dois tipos de origem. Fizeram-se, neste sentido, estudos sobre o vinagre (142, 143, 144) e o ácido cítrico (145).

Água :

A presença de compostos tensioactivos nas águas potáveis e minerais é um indício importante para a determinação da sua qualidade, uma vez que tais substâncias são, em regra, compostos coloidais de origem orgânica (146, 147, 148, 149; 150, 151).

Tendo-se passado em revista os principais campos de utilização deste método, queremos-nos referir, particularmente, aos dois tipos de máximos mais empregues.

Na maioria dos trabalhos referidos, as acções supressoras foram estudadas no máximo que acompanha a primeira onda de

redução do oxigénio (*) a partir de uma solução de cloreto de potássio 0,001 M, em célula polarográfica aberta. No entanto, como a altura desse máximo depende da concentração do oxigénio na solução torna-se difícil uma perfeita padronização, pelo que sempre que se pretenda dosear uma substância utilizando essa propriedade, se deve empregar, de preferência, o máximo presente na onda de redução de certos metais, tais como o cobre e o cobalto. Este último elemento, em solução amoniacal tamponada, apresenta máximos reprodutíveis e possuindo sensibilidade apropriada.

*

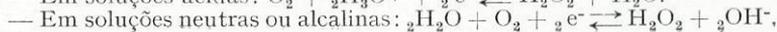
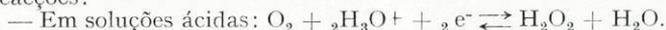
*

*

A di-hidro-estreptomicina reduz a altura do máximo da onda catódica do cobalto, propriedade que não é específica dela pois como acabámos de expor, outras substâncias podem apresentar esse mesmo efeito. No entanto, dada a grande sensibilidade do tipo de dosagem polarográfica que se fundamenta nessa propriedade, a aplicação à di-hidro-estreptomicina justifica-se plenamente se tivermos em conta que pretendemos para este antibiótico um processo analítico de sensibilidade semelhante ao método microbiológico e de execução menos morosa.

Antes de descrevermos o método de determinação polarográfica do sulfato de di-hidro-estreptomicina, estudaremos as concentrações de antibiótico capazes de originarem máximos polarográficos com uma altura apropriada e verificaremos se nessa zona de valores existe boa proporcionalidade entre a concentração e a altura daqueles. A determinação polarográfica do antibiótico foi executada com o polarógrafo Sargent, *modelo XXI*, pois é dos polarógrafos correntes o que melhor se presta para este tipo de dosagem, dado que as dimensões do papel onde os polarogramas são traçados permitem a obtenção de máximos de altura conveniente; o polarógrafo de raios catódicos não se pode utilizar neste caso, visto este aparelho eliminar qualquer máximo que acompanhe uma determinada onda polarográfica, devido à existência de um sistema compensador apropriado.

(*) A primeira onda seria, segundo KOLTHOFF e MILLER (152), devida à redução do oxigénio a peróxido de hidrogénio, de acordo com as seguintes reacções:



Igualmente verificaremos a concordância entre este método polarográfico e o método microbiológico, doseando pelos dois métodos algumas especialidades farmacêuticas contendo sulfato de di-hidro-estreptomicina e também soluções deste antibiótico que tenham sofrido uma diminuição de actividade por efeito da força iónica do meio ou da temperatura.

Estudaremos, também, a influência do sulfato e do pantotenato de estreptomicina e de alguns produtos de degradação deste antibiótico sobre a dosagem polarográfica da di-hidro-estreptomicina.

Finalmente, aplicaremos o método proposto para o sulfato de di-hidro-estreptomicina à determinação do pantotenato do mesmo antibiótico, indicando-se a sensibilidade limite e, com um estudo estatístico a precisão obtida.

**1 — Técnica proposta para a dosagem do sulfato
de di-hidro-estreptomicina por método baseado na diminuição
do máximo polarográfico presente na onda do cobalto**

Modo operatório:

Introduzimos na célula polarográfica 3 ml de cada solução obtida do modo seguinte:

- 1 ml de solução de sulfato de di-hidro-estreptomicina de concentração conveniente (13,0 $\mu\text{g/ml}$ a 24,8 $\mu\text{g/ml}$).
- 9 ml de electrólito-suporte de cloreto de cobalto amoniacal (*) a *pH* 11, com a composição que a seguir indicamos:

Cloreto de cobalto, hexa-hidratado	0,38 g
Cloreto de amónio	5,35 g
Solução de hidróxido de amónio 0,1N q. b. p.	1000 ml

(*) Tampão cuja concentração em cloreto do cobalto foi estudada tendo em vista a obtenção de máximos polarográficos com características próprias a este tipo de dosagem.

Preparação: Dissolver em cerca de 100 ml de água bidestilada o cloreto de cobalto e o cloreto de amónio e, em seguida, perfazer o volume de 500 ml. À parte, diluir 100 ml de solução de hidróxido de amónio N até cerca de 500 ml. Juntar esta solução, lentamente e com agitação, à primeira e perfazer o volume de 1000 ml com água bidestilada.

O tampão tem um tempo de conservação limitado, cerca de uma semana, turvando depois deste período de tempo.

Fizemos passar, durante 10 minutos, uma corrente de azoto purificado para promover a eliminação do oxigénio, obtendo-se, depois, os polarogramas nas seguintes condições:

Tempo de gota: 4 seg.
Altura da coluna de mercúrio: 20 cm.
Massa do mercúrio medida em água destilada: 3,10 mg seg⁻¹.
Temperatura: 20°.
Sensibilidade: 0,100 $\mu A/mm$.

Resultados:

Na *figura 24* reproduzimos dois polarogramas obtidos nas condições que acabámos de mencionar, nos quais indicamos a maneira seguida para a determinação da altura do máximo da onda de redução do cloreto de cobalto, em solução amoniacal.

As concentrações do antibiótico e as alturas dos máximos correspondentes encontram-se reunidas no Quadro XXV, valores que nos serviram para a obtenção da *curva-padrão* do sulfato de di-hidro-estreptomicina (*Fig. 25*) que se destaca pela sua boa linearidade.

Precisão e sensibilidade limite:

Tendo em vista conhecer a precisão e reprodutibilidade do método, fizemos um estudo estatístico num total de 10 ensaios distintos, para três concentrações de sulfato de di-hidro-estreptomicina correspondentes a três pontos médios da *curva-padrão*. Os resultados desse estudo são indicados no Quadro XXVI.

Queremos ainda referir que, em face da sensibilidade limite de dosagem (1,30 $\mu g/ml$ de antibiótico) o método que propomos tem uma sensibilidade comparável à dos métodos microbiológicos, apresentando, no entanto, uma precisão bastante superior.

2 — Estudo comparativo dos métodos polarográfico e microbiológico na dosagem do sulfato de di-hidro-estreptomicina

Na dosagem de um antibiótico por método físico-químico tem importância primordial o conhecimento da concordância dos resultados obtidos por este método e pelo microbiológico.

Assim, para verificarmos a validade da dosagem polarográfica que propusemos para o sulfato de di-hidro-estreptomicina,

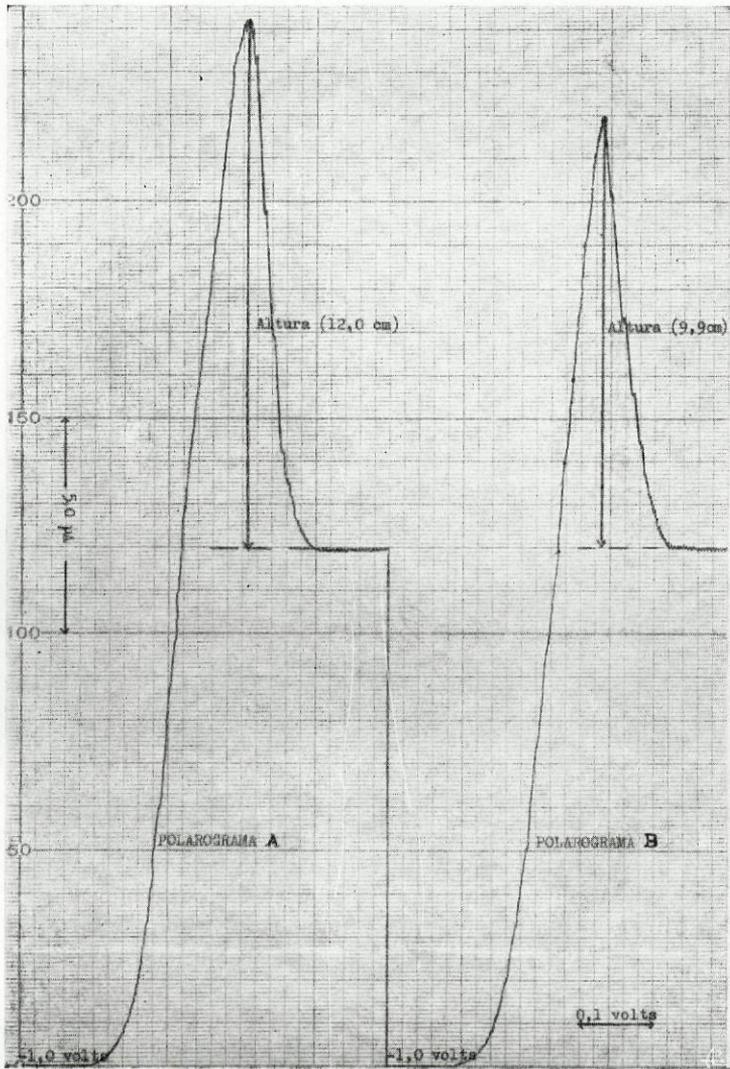


Fig. 24

Polarogramas obtidos a partir de cloreto de cobalto em solução amoniacal contendo sulfato de di-hidro-estreptomicina respectivamente nas concentrações de $1,59 \mu\text{g/ml}$ e de $1,89 \mu\text{g/ml}$

QUADRO XXV

Valores empregues no estabelecimento da *curva-padrão* do sulfato de di-hidro-estreptomicina em polarógrafo Sargent

Concentrações $\mu\text{g}/\text{ml}$	Altura do máximo polarográfico μA	K $\text{mg}/\text{l}/\mu\text{A}$
2,48	5,5	—
2,19	7,7	0,13
1,89	9,9	0,13
1,59	12,0	0,13
1,30	14,6	0,13

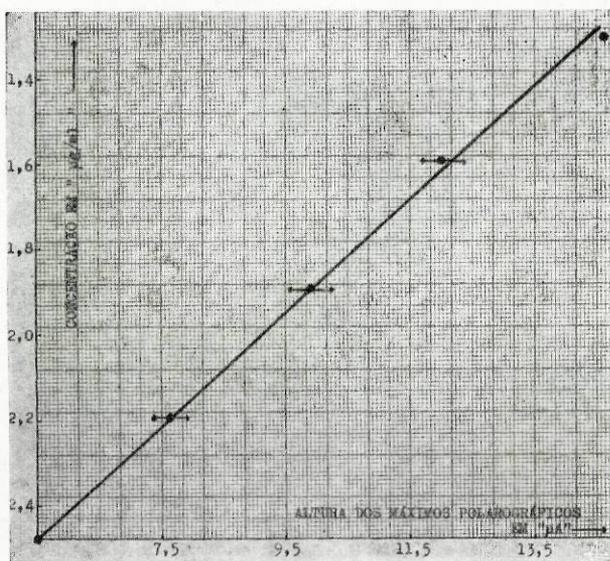


Fig. 25

Curva-padrão do sulfato de di-hidro-estreptomicina obtida em polarógrafo Sargent XXI

praticámos, paralelamente, os dois métodos em especialidades farmacêuticas contendo este antibiótico, indicando-se, previamente, a técnica microbiológica seguida.

a) Método microbiológico utilizado

Adoptámos o método do cilindro-placa, segundo a técnica descrita para a dosagem do sulfato de estreptomicina (*pág. 54*).

QUADRO XXVI

Estudo estatístico da dosagem do sulfato de di-hidro-estreptomicina empregando polarógrafo Sargent XXI

Tomada de ensaio do antibiótico $\mu\text{g/ml}$	Altura dos máximos polarográficos μA	Média das alturas dos máximos pol. μA	Erro padrão da média (s.m)	Limite de confiança a 95% $t = 2,3$	Limite relativo $\mu\text{g/ml}$
2,19	7,6 - 7,5 - 7,8 7,7 - 7,8 - 7,7 7,6 - 7,8 - 7,9 - 7,5	7,69	0,13	0,30	$2,19 \pm 0,09$
1,89	9,9 - 10,1 - 10,2 9,8 - 9,8 - 9,9 9,7 - 9,7 - 9,9 - 9,9	9,89	0,16	0,37	$1,89 \pm 0,08$
1,59	11,9 - 12,0 - 12,0 11,9 - 12,2 - 12,3 11,8 - 12,0 - 11,8 - 12,1	12,00	0,16	0,37	$1,59 \pm 0,05$

Trabalhámos com padrão fornecido pela *U. S. A. Reference Standard*, que por ser higroscópico foi mantido em excicador sob vazio.

A solução padrão foi preparada dissolvendo quantidade con-

veniente de antibiótico em tampão fosfatado de *pH* 6 (*) estéril, de maneira a ficar com a concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$ em di-hidro-estreptomicina-base. Esta solução foi conservada no frigorífico por tempo não superior a 30 dias.

Obtenção da curva-padrão:

De modo análogo ao descrito para a dosagem microbiológica do sulfato de estreptomicina diluiu-se a solução padrão de sulfato de di-hidro-estreptomicina com tampão de fosfato de *pH* 8 (*), a fim de obter concentrações, respectivamente, de 0,6 - 0,7 - 0,8 - 0,9 - 1,0 - 1,1 - 1,2 - 1,3 - 1,4 - 1,5 $\mu\text{g/ml}$. Preparadas as placas e incubadas por 16 a 18 horas a 37°, mediram-se os diâmetros de inibição correspondentes a cada uma das concentrações. Tomando em ordenadas os valores correspondentes às concentrações e em abcissas o diâmetro corrigido (**), traçamos a *curva-padrão* em papel semi-logarítmico (ver Quadro XXVII e figura 26).

QUADRO XXVII

Valores que nos serviram para o traçado da *curva-padrão* do sulfato de di-hidro-estreptomicina, por método microbiológico

Concentrações $\mu\text{g/ml}$	Valor do diâmetro das zonas de inibição, depois de corrigido <i>mm</i>
0,6	15,1
0,7	18,5
0,8	20,9
0,9	22,8
1,0	24,1
1,1	25,1
1,2	26,0
1,3	26,8
1,4	27,4
1,5	28,0

(*) Tampões descritos na dosagem microbiológica do sulfato de estreptomicina (págs. 56, 57, notas (**), e (*)).

(**) Ver pág. 57, nota (**).

b) Confronto entre os métodos polarográfico e microbiológico

Obtida a *curva-padrão*, praticámos a dosagem do sulfato de di-hidro-estreptomicina em especialidades farmacêuticas, empregando concomitantemente o método polarográfico e o microbiológico descritos anteriormente.

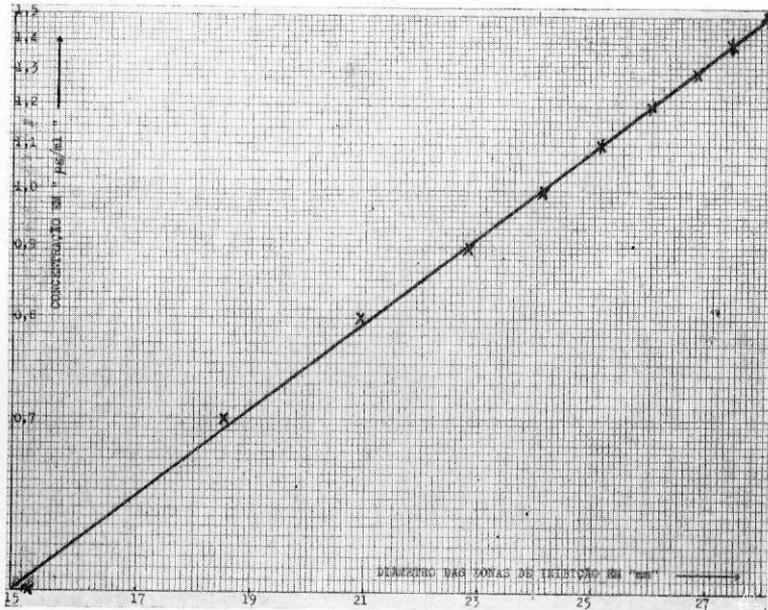


Fig. 26

Curva-padrão do sulfato de di-hidro-estreptomicina obtida por método microbiológico

Especialidades farmacêuticas em estudo (*):

— *Dihydrostreptomycine* DIAMANT

COMPOSIÇÃO:

Frasco contendo 1 grama de di-hidro-estreptomicina base sob a forma de sulfato.

(*) Especialidades farmacêuticas adquiridas na Suíça, cujos Laboratórios fabricantes foram já indicados para as especialidades contendo sulfato de estreptomicina (pág. 59).

— *Dihydrostreptomycin sulfato* MERCK

COMPOSIÇÃO:

Frasco contendo 5 gramas de di-hidro-estreptomicina base sob a forma de sulfato.

— *Dihydrostreptomycin* NOVO

COMPOSIÇÃO:

Frasco contendo 5 gramas de di-hidro-estreptomicina base sob a forma de sulfato, dissolvidos em 20 ml de solução tampoadada e adicionada de agentes conservadores.

Dosagem polarográfica:

A determinação polarográfica da di-hidro-estreptomicina nas especialidades farmacêuticas que acabámos de referir foi executada de acordo com o modo operatório utilizado na obtenção da *curva-padrão* deste antibiótico em polarógrafo Sargent XXI (pág. 82). Empregámos o método dos padrões internos, juntando uma quantidade de antibiótico padrão correspondente a 20 por cento da quantidade que esperamos dosar.

No Quadro XXVIII apresentamos os resultados obtidos na dosagem polarográfica das três especialidades e a respectiva análise estatística. O grau de pureza do antibiótico foi traduzido em percentagem, por comparação com um padrão de sulfato de di-hidro-estreptomicina.

Dosagem microbiológica:

Os valores obtidos e o seu estudo estatístico encontram-se discriminados no Quadro XXIX, calculando-se a actividade do antibiótico em percentagem, em relação ao sulfato de di-hidro-estreptomicina padrão.

Discussão e conclusões

Em conformidade com os resultados da dosagem polarográfica (Quadro XXVIII) verificamos a boa precisão e reprodutibilidade deste método, facto que tinha sido devidamente assinalado a quando da dosagem do antibiótico puro (pág. 83).

Comparando os resultados dos estudos estatísticos feitos para

a dosagem polarográfica e microbiológica (Quadros XXVIII e XXIX), observa-se uma nítida concordância entre os referidos métodos.

QUADRO XXVIII

Estudo estatístico da dosagem polarográfica
do sulfato de di-hidro-estreptomicina em especialidades farmacêuticas

Especialidades farmacêuticas em estudo	Actividade do antibiótico em percentagem	Média aritmética (m)	Erro padrão da média (s _m)	Límite de confiança a 95% t = 2,3
<i>Dihydrostreptomycine</i> DIAMANT	99,04 - 99,77 - 98,04 100,55 - 101,08 - 100,16 100,22 - 101,07 - 101,20 - 100,87 -	100,20	0,83	100,20 ± 1,91
<i>Dihydrostreptomycin sulfate</i> MERCK	101,08 - 101,58 - 100,64 102,13 - 99,10 - 102,13 101,16 - 101,08 - 102,26 - 101,80 -	101,30	0,83	101,30 ± 1,91
<i>Dihydrostreptomycin</i> Novo	98,54 - 99,23 - 99,60 100,08 - 100,57 - 100,62 99,75 - 98,00 - 100,71 - 100,02 -	99,71	0,93	99,71 ± 2,14

Além de uma maior precisão, o método polarográfico possui em relação ao microbiológico, as vantagens de uma maior rapidez e comodidade, o que permite realizar a dosagem da di-hidro-estreptomicina em menos de uma hora.

3 — Ensaio de estabilidade do sulfato de di-hidro-estreptomicina

Dadas as condições particulares do tipo de dosagem polarográfica proposta para o sulfato de di-hidro-estreptomicina, há todo o interesse em conhecer as possibilidades de emprego deste pro-

cesso nos casos em que o antibiótico sofreu uma diminuição de actividade por efeito de um meio com uma concentração hidrogeniônica desfavorável ou do calor. Para isso, realizámos os ensaios de estabilidade que a seguir se descrevem, empregando, paralelamente, o método microbiológico de modo a confirmar os respectivos resultados.

QUADRO XXIX

**Estudo estatístico da dosagem microbiológica
do sulfato de di-hidro-estreptomicina em especialidades farmacêuticas**

Especialidades farmacêuticas em estudo	Actividade do antibiótico em percentagem	Média aritmética (m)	Erro padrão da média (s_m)	Limite de confiança a 95% $t = 2,3$
<i>Dihydrostreptomycine</i> DIAMANT	98,72 - 102,10 - 103,73 98,61 - 100,03 - 91,25 97,43 - 109,10 - 101,57 - 101,86 -	100,44	5,98	100,44 \pm 13,75
<i>Dihydrostreptomycine sulfato</i> MERCK	98,72 - 92,80 - 103,80 99,69 - 103,78 - 100,24 104,77 - 100,10 - 102,96 - 110,54 -	101,74	6,10	101,74 \pm 14,03
<i>Dihydrostreptomycin</i> Novo	94,35 - 99,31 - 107,40 96,74 - 97,66 - 106,89 99,72 - 100,04 - 101,11 - 101,68 -	98,69	5,90	98,69 \pm 13,57

Empregámos em todos estes estudos de estabilidade o método polarográfico atrás descrito para este antibiótico (*pag. 89*), em presença de padrão interno, tendo em atenção a *curva-padrão* a que já fizemos referência.

Em todas as determinações executadas pelos dois métodos, exprimimos, os resultados analíticos pelo valor médio respeitante a cinco dosagens distintas.

- a) Estudo de estabilidade do sulfato de di-hidro-estreptomicina em solução de hidróxido de sódio decinormal

Condições do ensaio:

Preparámos uma solução de sulfato de di-hidro-estreptomicina na concentração de $146 \mu\text{g/ml}$ em hidróxido de sódio decinormal, a qual foi submetida à dosagem polarográfica e microbiológica após 1, 2, 19, 75 e 144 horas de ter sido preparada.

A dosagem polarográfica foi executada, depois de se haver procedido às diluições convenientes das soluções em análise, de modo que a concentração final seja a própria para exercer o efeito inibidor sobre o máximo polarográfico presente na onda que o cobalto mostra em solução amoniacal.

A dosagem microbiológica foi efectuada, segundo técnica atrás descrita, após neutralização da solução do antibiótico em análise.

Resultados e conclusões:

A simples observação das curvas de estabilidade representadas na *figura 27*, as quais foram traçadas de acordo com os valores analíticos inscritos no Quadro XXX, revelam-nos ser o método polarográfico proposto aplicável mesmo quando o antibiótico tenha sofrido a acção do hidróxido de sódio decinormal.

- b) Estudo de estabilidade do sulfato de di-hidro-estreptomicina em solução de hidróxido de sódio normal

Preparámos uma solução do antibiótico em hidróxido de sódio normal com uma concentração idêntica à do ensaio anterior ($146 \mu\text{g/ml}$) e mantivemos as condições operatórias usadas nesse ensaio.

Os resultados da dosagem polarográfica e microbiológica estão inscritos no Quadro XXXI, os quais serviram para a construção das curvas de estabilidade respeitantes a cada dosagem (Fig. 28).

Resultados e conclusões:

O exame das curvas de estabilidade da *figura 28*, indica-nos que o sulfato de di-hidro-estreptomicina sofreu para o mesmo tempo de preparação, uma perda de actividade superior à observada no estudo precedente, mostrando a dosagem polarográfica

e microbiológica que 120 horas após a preparação, apenas restam 60 por cento da quantidade inicial de antibiótico.

Da concordância dos resultados entre os dois métodos empregues, podemos concluir que o método polarográfico tem interesse mesmo na dosagem de sulfato de di-hidro-estreptomicina que tenha sofrido uma destruição parcial sob influência de solução de hidróxido de sódio normal.

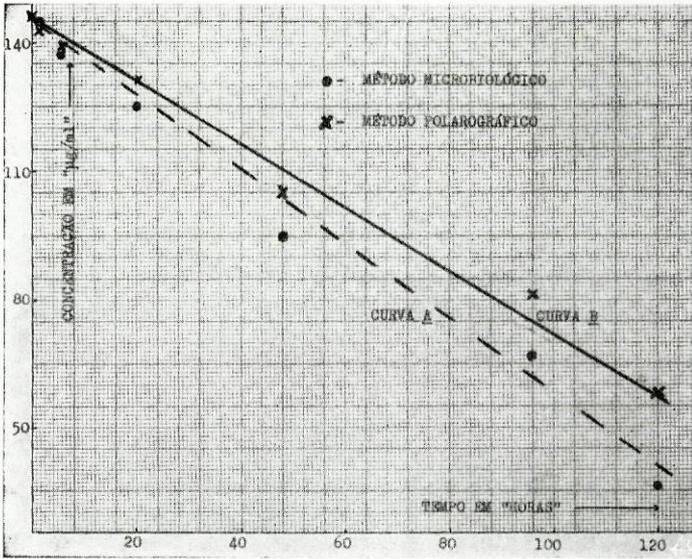


Fig. 27

Curvas de estabilidade do sulfato de di-hidro-estreptomicina em solução de hidróxido de sódio decinormal

Curva A — Curva obtida por método microbiológico

Curva B — Curva obtida por método polarográfico

c) Estudo da estabilidade de uma solução de sulfato de di-hidro-estreptomicina à acção do calor

Enchemos uma série de ampolas com solução de sulfato de di-hidro-estreptomicina em água bidestilada, na concentração de $146 \mu\text{g/ml}$, tendo-se fechado estas em atmosfera de azoto. As ampolas foram depois submetidas a um aquecimento em b. a.,

retirando-se do banho, após períodos de tempo variáveis, lotes de três ampolas, sobre as quais realizámos a dosagem polarográfica e microbiológica do antibiótico.

QUADRO XXX

Varição da concentração do sulfato de di-hidro-estreptomicina em função do tempo que medeia entre a obtenção da solução em OHNa N/10 e a sua dosagem por método polarográfico e microbiológico

Tempo em horas	Concentrações determinadas por método polarográfico <i>µg/ml</i>	Concentrações determinadas por método microbiológico <i>µg/ml</i>
—	146	146
1	146	144
2	145	144
19	141,2	138
75	122	126
144	102	89

Os tempos de aquecimento e os resultados da análise pelos dois métodos estão inscritos na Quadro XXXII, os quais nos serviram para o traçado das curvas de estabilidade (Fig. 29).

Resultados e conclusões:

A observação das curvas de estabilidade do antibiótico em função do tempo de aquecimento (Fig. 29), revela-nos ter o antibiótico sofrido, após 160 minutos de aquecimento a b. a., uma perda de actividade de cerca de 20 por cento. Os resultados da dosagem microbiológica são perfeitamente concordantes com os obtidos pelo método polarográfico, o que permite afirmar ser este método aplicável nos casos em que o antibiótico tenha sofrido a acção da temperatura.

4 — Influência de sais da estreptomicina e de alguns produtos de degradação deste antibiótico sobre a dosagem polarográfica da di-hidro-estreptomicina

Embora o método que se fundamenta na redução da altura do máximo da onda polarográfica do cobalto em meio amoniacal não se possa considerar como específico da di-hidro-estreptomi-

QUADRO XXXI

Variação da concentração do sulfato de di-hidro-estreptomicina em função do tempo que medeia entre a obtenção da solução em OHNa N/1 e a sua dosagem por método polarográfico e microbiológico

Tempo em horas	Concentrações determinadas por método polarográfico <i>µg/ml</i>	Concentrações determinadas por método microbiológico <i>µg/ml</i>
—	146	146
1	143	145
4	139	137
20	131	125
48	105	95
96	81	67
120	58	46

cina, ele é, no entanto, muito sensível e bastante preciso. O problema da existência de outros produtos que actuam sobre esse máximo, particularmente as substâncias tensoactivas e algumas de elevado peso molecular, tem uma grande importância, especialmente, na dosagem da di-hidro-estreptomicina em especialidades farmacêuticas. Nestas, podem existir além do antibiótico outros princípios activos ou simplesmente agentes conservadores ou substâncias tamponantes, que sejam susceptíveis de interferir na dosagem.

Uma das finalidades do estudo que pretendemos fazer foi a de conhecermos o comportamento dos sais de estreptomicina, em particular do sulfato e do pantotenato, sobre o máximo polarográfico da onda do cobalto, pois num grande número de especialidades farmacêuticas aparecem associados sais de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina.

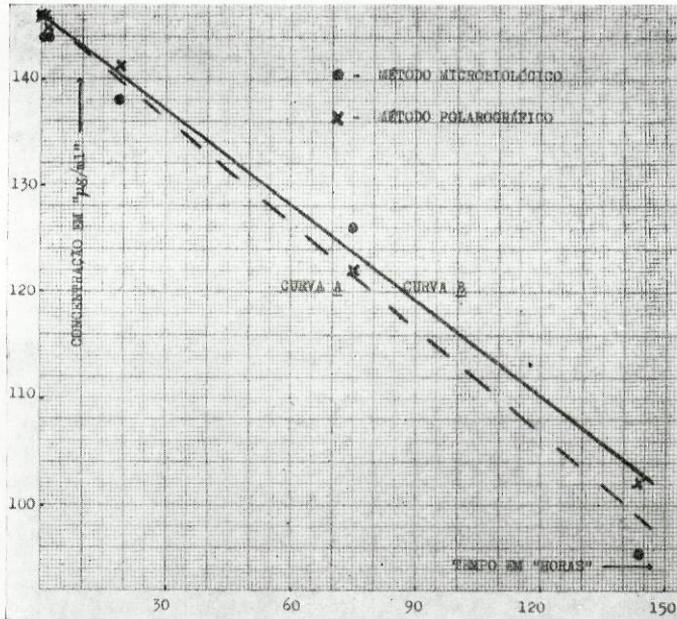


Fig. 28

Curvas de estabilidade do sulfato de di-hidro-estreptomicina em solução de hidróxido de sódio normal

Curva A — Curva obtida por método microbiológico

Curva B — Curva obtida por método polarográfico

Estudada a influência desses sais de estreptomicina, verificou-se que tanto o sulfato como o pantotenato de estreptomicina possuem também a faculdade de reduzirem a altura desse máximo polarográfico. Como seria de prever, dada a analogia química dos dois sais de di-hidro-estreptomicina, o derivado do ácido

pantoténico é capaz de exercer também, o mesmo efeito inibidor que o sulfato de di-hidro-estreptomicina.

Ensaíamos, ainda, alguns dos produtos de degradação da di-hidro-estreptomicina com o fim de observarmos se estes actuam

QUADRO XXXII

Variação da concentração de sulfato de di-hidro-estreptomicina em função do tempo de aquecimento a b. a.

Tempo em minutos	Concentrações determinadas por método polarográfico $\mu\text{g/ml}$	Concentrações determinadas por método microbiológico $\mu\text{g/ml}$
—	146	146
22	133,6	132,8
37	129,2	130,8
56	124	124
90	120	115
126	104	112
160	94	100

de modo semelhante sobre o referido máximo. Começamos por analisar, em primeiro lugar, o comportamento da glicose, substância que faz parte integrante da molécula destes antibióticos, seguindo-se o estudo polarográfico da glucosamina e da N-metil-glucosamina.

A glicose, mesmo na concentração de 10^{-1} M, não provoca qualquer diminuição na altura desse máximo, verificando-se, ainda, que a adição deste glúcido a uma solução de sulfato de di-hidro-estreptomicina não interfere na dosagem desta substância. Pelo contrário, a glucosamina e a N-metil-glucosamina na concentração de 5×10^{-2} M exercem sobre o máximo polarográfico o mesmo efeito que o sulfato de di-hidro-estreptomicina na concentração de 10^{-6} M.

Em conclusão, podemos afirmar que alguns dos produtos de

decomposição deste grupo de antibióticos interferem na dosagem da di-hidro-estreptomicina, se estiverem presentes em concentração elevada.

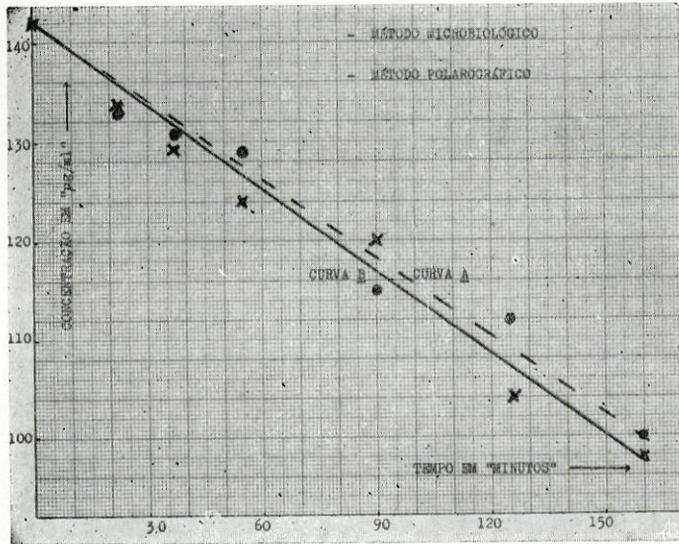


Fig. 29

Curvas de estabilidade do sulfato de di-hidro-estreptomicina em função do tempo de aquecimento a b. a.

Curva A — Curva obtida por método microbiológico
Curva B — Curva obtida por método polarográfico

5 — Aplicação do método de redução do máximo polarográfico da onda do cobalto, à dosagem do pantotenato de di-hidro-estreptomicina

Tendo-se verificado que o pantotenato de di-hidro-estreptomicina é capaz, também, de diminuir a altura do máximo polarográfico da onda do cobalto, aplicámos a este sal o método polarográfico estudado para o sulfato de di-hidro-estreptomicina.

Modo operativo:

A dosagem foi executada em polarógrafo Sargent XXI, procedendo-se de modo análogo ao descrito para a dosagem do sulfato de di-hidro-estreptomicina (*pág. 82*) no que se refere ao electrólito-suporte e à técnica de eliminação do oxigénio.

Os polarogramas foram obtidos nas seguintes condições:

Tempo de gota: 3 *seg.*

Altura da coluna de mercúrio: 22 *cm.*

Massa do mercúrio medida em água destilada: 3,00 *mg seg.⁻¹.*

Temperatura 22°.

Sensibilidade: 0,100 $\mu A/mm$.

QUADRO XXXIII

Valores usados na obtenção da *curva-padrão* do pantotenato de di-hidro-estreptomicina com polarógrafo Sargent XXI

Concentrações $\mu g/ml$	Altura dos máximos polarográficos μA	K $mg/l/\mu A$
3,64	7,9	—
3,28	9,9	0,18
2,92	11,9	0,18
2,55	14,0	0,18
2,19	16,3	0,17

No Quadro XXXIII indicamos as concentrações do antibiótico empregues na obtenção da *curva-padrão* (Fig. 30), assim como as alturas dos respectivos máximos polarográficos.

Sensibilidade limite e precisão:

Como sensibilidade limite de dosagem obtivemos o valor de 2,19 $\mu g/ml$ de pantotenato de di-hidro-estreptomicina, sensibili-

dade esta que é comparável à verificada na dosagem do sulfato de di-hidro-estreptomicina pelo mesmo método.

O rigor deste processo de determinação foi avaliado por um estudo estatístico executado para três concentrações do antibió-

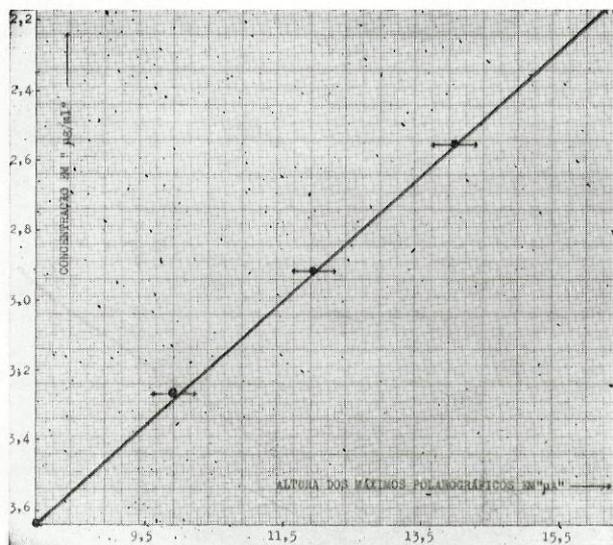


Fig. 30

Curva-padrão do pantotenato de di-hidro-estreptomicina com polarógrafo Sargent XXI (método de redução da altura do máximo da onda do cobalto)

tico correspondentes a valores intermédios da *curva-padrão* (Quadro XXXIV), estudo, que revelou uma precisão semelhante à obtida na dosagem do sulfato de di-hidro-estreptomicina.

B—Determinação do sulfato de di-hidro-estreptomicina por método indirecto: oxidação periódica do antibiótico seguida de dosagem polarográfica do formaldeído libertado.

Embora a dosagem da di-hidro-estreptomicina pelo método da redução do máximo da onda do cobalto seja bastante sensível, não pode, no entanto, ser aplicada a misturas contendo sais de

estreptomicina, que actuam também sobre esse máximo polarográfico. Devido a este facto, procurámos estudar outro processo que pudesse ser específico da di-hidro-estreptomicina em presença da estreptomicina, e em que se recorresse também ao método polarográfico.

Em virtude de a di-hidro-estreptomicina ter um grupo alcoólico livre fez-nos pensar na possibilidade de aplicação de uma técnica muito usada na determinação polarográfica de alguns álcoois. Consiste esta, em linhas gerais, numa prévia oxidação do álcool pelo ácido periódico, seguindo-se a dosagem polarográfica do aldeído libertado.

QUADRO XXXIV

Estudo estatístico da dosagem do pantotenato de di-hidro-estreptomicina com polarógrafo Sargent XXI (método da redução da altura do máximo polarográfico da onda do cobalto)

Tomada de ensaio do antibiótico $\mu\text{g/ml}$	Altura dos máximos polarográficos μA	Média das alturas dos máximos pol. μA	Erro padrão da média (s_m)	Limite de confiança a 95 % $t = 2,3$	Limite relativo $\mu\text{g/ml}$
3,28	9,2 - 9,6 - 9,5 9,7 - 9,6 - 9,6 9,5 - 9,6 - 9,6 - 9,2 -	9,51	0,17	0,39	$3,28 \pm 0,13$
2,92	11,6 - 11,5 - 11,3 11,4 - 11,6 - 11,3 11,4 - 11,3 - 11,2 - 11,2 -	11,41	0,15	0,35	$2,92 \pm 0,09$
2,55	13,6 - 13,8 - 13,7 13,4 - 13,5 - 13,8 13,9 - 13,8 - 13,7 - 13,4 -	13,66	0,18	0,41	$2,55 \pm 0,08$

WARSHOWSKY e ELVING (¹⁵³) determinaram numa mistura de etilenoglicol e de 1,2-propilenoglicol cada um dos constituintes, fazendo uma prévia oxidação dos glicóis com ácido periódico, e doseando, em seguida, polarograficamente, o formaldeído e o



acetaldeído formados. A oxidação dos dois álcoois passa-se de acordo com as seguintes equações:



O conteúdo em acetaldeído dá-nos indicação da quantidade de propilenoglicol existente, enquanto que o etilenoglicol é determinado, subtraindo o formaldeído produzido pela oxidação do propilenoglicol, à quantidade total de formaldeído presente na mistura. Nesta dosagem polarográfica é recomendado o emprego do electrólito-suporte constituído por hidróxido de lítio 0,1 M e cloreto de lítio 0,01 M, visto originar ondas polarográficas bem separadas para o formaldeído e para o acetaldeído.

CANNON e JACKSON ⁽¹⁵⁴⁾ verificaram que o método que acabámos de referir não era aconselhado para a dosagem de pequenas quantidades de 1,2-propilenoglicol em presença de etilenoglicol, pois a onda respeitante ao formaldeído interfere no cálculo da altura da pequena onda do acetaldeído. Esta dificuldade foi resolvida, em parte, pelos Autores usando como electrólito, solução de acetato de lítio N/1 a *pH* 7, já que a altura da onda do formaldeído é apreciavelmente reduzida a este valor de *pH*, sendo a onda correspondente ao acetaldeído muito pouco afectada para valores de *pH* compreendidos entre 6,8 a 12,7. Com esta modificação puderam dosear, como quantidade mínima, 1 parte de 1,2-propilenoglicol em presença de 500 partes de etilenoglicol.

A glicerina também tem sido doseada a partir de líquidos de fermentação, que foram previamente purificados por solução alcoólica de carbonato de sódio, determinando-se polarograficamente o formaldeído resultante da oxidação da glicerina pelo ácido periódico ⁽¹⁵⁵⁾. A dosagem foi executada com uma precisão de $\pm 5\%$, tendo-se observado que a glicose não exerce qualquer influência no ensaio.

No processo indicado por FRANCIS ⁽¹⁵⁶⁾ para a dosagem de diglicóis (dietilenoglicol, dipropilenoglicol ou a mistura de ambos), removem-se, em primeiro lugar, os monoglicóis por oxidação com ácido periódico, destilando depois os aldeídos resultantes. A concentração em diglicol é determinada por método polarográfico indirecto (redução do excesso do ácido periódico a iódico) no líquido que sofreu a destilação. Esta técnica foi usada na verificação do fabrico dos monoglicóis puros nos quais a percentagem de diglicóis deve ser inferior a 1%.

ZUMAN ^(157, 158) seguiu polarograficamente a cisão dos 1,2-glicóis pelo ácido periódico, estudando também o seu desaparecimento no decorrer da oxidação e a formação dos respectivos aldeídos.



*

*

*

Sem nos determos em grandes pormenores, focámos algumas das principais aplicações da técnica de oxidação periódica a certos álcoois e a subsequente determinação polarográfica dos aldeídos formados. Este método da oxidação periódica foi inicialmente usado no esclarecimento da estrutura da di-hidro-estreptomicina (⁴⁵, ⁴⁶, ⁴⁸, ¹⁵⁹, ¹⁶⁰, ¹⁶¹, ¹⁶²) e só mais tarde com fins analíticos.

Ao contrário do que sucede com a estreptomicina, a oxidação periódica da di-hidro-estreptomicina conduz sempre à formação de formaldeído, dada a presença de um grupo alcoólico livre na molécula deste antibiótico.

LEMIEUX, DE WALT e WOLFROM (¹⁶³) verificaram, efectivamente, que a di-hidro-estreptomicina ao ser oxidada com 1,5 moles de ácido periódico liberta cerca de 1 mole de formaldeído. Segundo FRIED e STAVELY (¹⁶⁴) é nula a libertação de formaldeído pela acção deste ácido sobre a estreptomicina B, enquanto que para a di-hidro-estreptomicina B a oxidação já origina a produção de uma mole de formaldeído.

O processo da oxidação periódica é, no entanto, bastante complexo, pois o ataque feito na molécula depende da concentração do ácido periódico e da temperatura a que é realizado. Assim, COLON e *col.* (⁷⁶) conduzindo a oxidação não há temperatura ambiente como é normalmente realizada (¹⁶⁵), mas a 100°, verificaram que mesmo a estreptomicina produzia formaldeído. Isto seria explicado pela elevada temperatura usada, a qual facilita a hidrólise do antibiótico a N-metil-glucosamina livre, que possui a estrutura 1,2-glicol necessária para a libertação de formaldeído. Estes Autores mostraram também que a oxidação periódica dos sais de estreptomicina, N-metil-glucosamina e glucosamina produzem iguais quantidades de formaldeído por mole. Deste modo, deve-se considerar que o formaldeído libertado pelos sais de estreptomicina provém apenas da porção da molécula correspondente à glucosamina.

O facto do efeito oxidante do ácido periódico poder ser acompanhado de fenómenos de hidrólise sobre a estreptomicina e a di-hidro-estreptomicina levou GARLOCK e GROVE (⁷⁵) a propor que o ataque da di-hidro-estreptomicina fosse realizado pelo metaperiodato de sódio. Com efeito, a oxidação periódica com este reagente opera-se, em relação ao ácido periódico livre, com menor intensidade, sendo menor o perigo de hidrólise do antibiótico, dado

o *pH* da solução do metaperiodato de sódio. Estes Autores partem de 5 ml de uma solução aquosa de di-hidro-estreptomicina contendo 20 mg/ml, a que adicionam 10 ml de solução de metaperiodato de sódio 0,05 M, deixando decorrer a oxidação por uma noite. Retiram 3 ml desta solução que saturam de tiosulfato de sódio, procedendo, em seguida, a uma destilação por corrente de vapor. No destilado encontra-se o formaldeído libertado por oxidação periódica, cuja dosagem é feita empregando o ácido cromotrópico segundo o método colorimétrico de Boos (¹⁶⁶), lendo-se a percentagem de transmissão em colorímetro fotoeléctrico utilizando filtro de 575 *mμ*. A curva de calibração é preparada oxidando soluções padrões de di-hidro-estreptomicina, destilando e procedendo aos mesmos tratamentos que os usados na dosagem da amostra. Por este método foram analisadas amostras comerciais de sulfato e de cloridrato de di-hidro-estreptomicina, tendo-se verificado a concordância entre este ensaio químico e o método microbiológico.

VAIL e BRICKER (⁷⁷) ao estudarem um método de dosagem para a di-hidro-estreptomicina e para a manosido-estreptomicina utilizando a oxidação periódica, fazem, em vez da destilação do formaldeído, a eliminação dos ácidos iódico e periódico por precipitação com solução de acetato de chumbo. Nestas condições, a dosagem do formaldeído pelo ácido cromotrópico é feita directamente na solução do antibiótico que sofreu a oxidação periódica.

*

*

*

Se bem que os dois métodos que acabamos de referir para a dosagem da di-hidro-estreptomicina ofereçam resultados analíticos comparáveis ao método microbiológico, são no entanto, de uma sensibilidade bastante inferior em relação a este método. Assim, com o fim de eliminarmos essa desvantagem usámos na determinação quantitativa do formaldeído, em substituição do método do ácido cromotrópico, um método polarográfico que nos proporcione uma maior sensibilidade de dosagem.

Antes de descrevermos a técnica polarográfica por nós estudada para a dosagem do formaldeído, mencionaremos algumas das principais técnicas polarográficas, referidas na literatura, para a dosagem desta substância.

O formaldeído é reduzível em eléctrodo de mercúrio gotejante, com formação de ondas bem definidas em electrólitos neu-

tros ou alcalinos. Tem um comportamento diferente dos outros aldeídos em solução aquosa (¹⁶⁷), pois combina-se com a água de acordo com a seguinte equação:



cujo equilíbrio está fortemente deslocado no sentido da direita. Antes da redução polarográfica do formaldeído, o composto formado em presença da água deverá ser desidratado e daí a amplitude da corrente de difusão depender do grau de desidratação e de outros factores que influenciem o referido equilíbrio como a temperatura, força iónica do meio, solvente e electrólitos. Por isso, na determinação quantitativa deve operar-se com electrólitos-suporte bem tamponados, controlando-se cuidadosamente os outros factores.

Na dosagem do formaldeído em presença do acetaldeído, propionaldeído e acrialdeído, WHITNACK e MOSHIER (¹⁶⁸) recomendaram como solução *de base* a constituída por hidróxido de lítio 0,1 M e cloreto de lítio 0,01 M a *pH* 13, adicionada de um supressor de máximo (1 ml de solução alcoólica de vermelho de metilo a 0,2% e 1,5 ml de solução alcoólica de verde de bromocresol a 0,02%, por litro de solução *de base*).

BOYD e *col.* (¹⁶⁹ ¹⁷⁰) empregaram também a técnica polarográfica na dosagem da serina: os hidrolisados proteicos contendo serina são tratados pelo ácido periódico, o que origina a formação de formaldeído que é então separado por destilação. Indicam como electrólito-suporte a mistura de hidróxido de potássio 0,2 M e de cloreto de potássio 0,4 M.

Num trabalho de SHULMAN e GRAVRIKOVA (¹⁷¹) sobre a dosagem dos aldeídos no etanol, faz-se referência ao emprego do hidróxido de lítio N/1 na determinação, em conjunto, do acetaldeído e formaldeído.

MAC NEVIN e *col.* (¹⁷²) estudaram polarograficamente o peróxido de hidrogénio e vários aldeídos, entre os quais o formaldeído, empregando solução de cloreto de lítio decinormal.

O formaldeído foi ainda doseado polarograficamente por SANDLER e CHUNG (¹⁷³) em presença de peróxido de hidrogénio e de acetaldeído, sendo o electrólito-suporte formado por hidróxido de lítio 0,07 M e por cloreto de lítio 0,03 M a *pH* 11,2. A interferência que o peróxido de hidrogénio exerce sobre a onda do formaldeído foi eliminada pela junção de tetracloreto de titânio.

Finalmente, queremos referir as condições de dosagem propostas por PASCIAK (¹⁷⁴) que submete ao processo polarográfico 0,5 ml da amostra a analisar em presença de 5 ml da mistura em partes iguais de ácido clorídrico 0,25 N e de cloreto de lítio da mesma normalidade contendo 0,03 % de gelatina, e fazendo a determinação à temperatura de 60°. Salieta a precisão de $\pm 1\%$, dando como limite inferior de dosagem o valor de 10 $\mu\text{g/ml}$ de formaldeído.

*

* *

Tendo-se passado em revista as técnicas de oxidação periódica com vista à análise da di-hidro-estreptomicina e mencionadas as principais variantes do método polarográfico empregue na dosagem do formaldeído, descreveremos, em primeiro lugar, o método polarográfico que melhores resultados nos proporcionou na determinação do formaldeído e, em seguida, o método que propomos para a dosagem dos sais de di-hidro-estreptomicina.

A determinação quantitativa do formaldeído é efectuada em polarógrafo Sargent, *modelo XXI* e em polarógrafo de raios catódicos, *modelo K 1000* «Southern», aparelhos que, possuindo sensibilidades bastante diferentes, permitem uma melhor apreciação das possibilidades do método polarográfico na dosagem desta substância. Para cada polarógrafo, daremos as condições de dosagem empregues tendo em vista a obtenção de uma *curva-padrão* que compreenda as quantidades mínimas doseáveis, bem como a precisão e reprodutibilidade obtidas.

O método que propomos para a dosagem da di-hidro-estreptomicina baseando-se, no que diz respeito à oxidação pelo meta-periodato de sódio, no processo indicado por GARLOCK e GROVE ⁽⁷⁵⁾ para a dosagem deste antibiótico, é, no entanto, mais sensível e de maior precisão, visto que, em vez da destilação do formaldeído e subsequente dosagem colorimétrica, se procede à determinação polarográfica do formaldeído libertado após eliminação pelo acetato de chumbo dos iões iódico e periódico.

a) Determinação polarográfica do formaldeído

1 - Dosagem empregando polarógrafo Sargent *XXI*

Modo operativo:

Introduzimos em célula polarográfica (*) 3 ml da mistura seguinte:

— 1 ml de solução de formaldeído de concentração apropriada (60 $\mu\text{g/ml}$ a 180 $\mu\text{g/ml}$).

(*) Célula polarográfica idêntica à descrita na dosagem do sulfato de estreptomicina (*pág. 32*).

— 9 ml de electrólito-suporte, constituído por partes iguais de solução de hidróxido de lítio 0,07 M e de solução de cloreto de lítio 0,03 M.

Eliminámos o oxigénio fazendo passar durante 10 minutos uma corrente de azoto previamente purificado, a qual atravessa também um pequeno frasco lavador contendo uma solução idêntica à que vai ser submetida à análise polarográfica. Deste modo, a corrente de azoto fica saturada em formaldeído, não ocasionando quaisquer perdas deste ao borbulhar na solução em análise.

Os polarogramas foram obtidos de acordo com as condições que a seguir mencionamos:

Tempo de gota: 3,1 seg.
 Altura da coluna de mercúrio: 30 cm.
 Massa do mercúrio medida em água destilada: 5,2 mg seg⁻¹.
 Temperatura: 22°.
 Sensibilidade: 0,015 $\mu A/mm$.

A qualidade das ondas polarográficas é bastante satisfatória para as concentrações de formaldeído empregues, podendo-se observar no polarograma da *figura 31* o modo de determinação da altura dessas ondas.

O potencial de semi-onda medido em relação ao eléctrodo de calomelanos saturado é de -1,65 volts.

Os resultados da dosagem mencionados no Quadro XXXV serviram-nos para o traçado da *curva-padrão* (Fig. 32).

Sensibilidade limite e precisão:

A técnica descrita permite a dosagem, em boas condições de precisão, de 6,0 $\mu g/ml$ de formaldeído como quantidade mínima.

De acordo com a orientação seguida nas dosagens anteriores, fizemos também um estudo estatístico sobre três concentrações intermédias da *curva-padrão*. Os resultados desse estudo, inscritos no Quadro XXXVI, dão-nos indicações sobre o grau de precisão e reprodutibilidade do método.

2 — Dosagem empregando polarógrafo de raios catódicos

Na obtenção da *curva-padrão* seguimos o modo operatório que acabámos de descrever na dosagem do formaldeído com polarógrafo Sargent, tendo as soluções desta substância, a diluir com o

tampão, concentrações compreendidas entre $0,6 \mu\text{g/ml}$ a $2,6 \mu\text{g/ml}$.
Os polarogramas foram obtidos nas condições seguintes:

Tempo de gota: $\approx 6,5 \text{ seg.}$
 Altura da coluna de mercúrio: $20,8 \text{ cm.}$
 Massa de mercúrio medida em água destilada: $3,03 \text{ mg seg.}^{-1}$.
 Temperatura: 19° .
 Factor de escala: $0,025$.
 Potencial no início: $-1,35 \text{ volts.}$

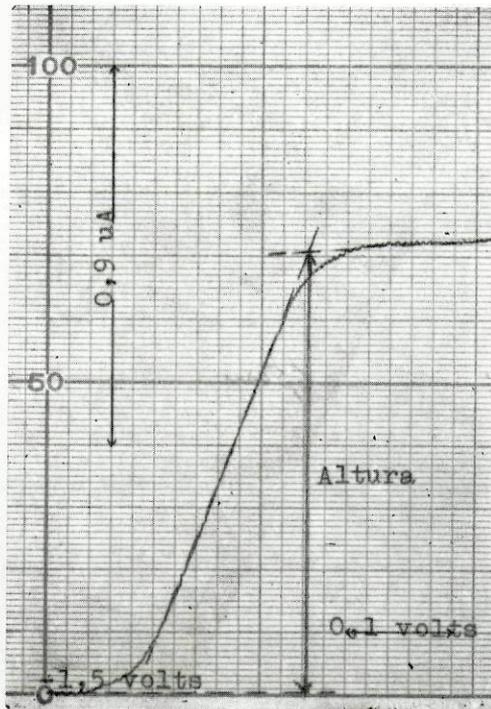


Fig. 31

Polarograma obtido com polarógrafo Sargent *XXI* para uma concentração de formaldeído de $12,0 \mu\text{g/ml}$

Na *figura 33* apresentamos dois polarogramas, obtidos nestas condições, para concentrações respectivamente de $0,11 \mu\text{g/ml}$ e de $0,21 \mu\text{g/ml}$ de formaldeído.

QUADRO XXXV

Valores que nos serviram para o traçado da *curva-padrão* do formaldeído com polarógrafo Sargent XXI

Concentrações $\mu\text{g/ml}$	Altura das ondas polarográficas μA	K $\text{mg/l}/\mu\text{A}$
6,0	0,51	—
9,0	0,78	11,1
12,0	1,05	11,1
15,0	1,35	10,7
18,0	1,56	11,4

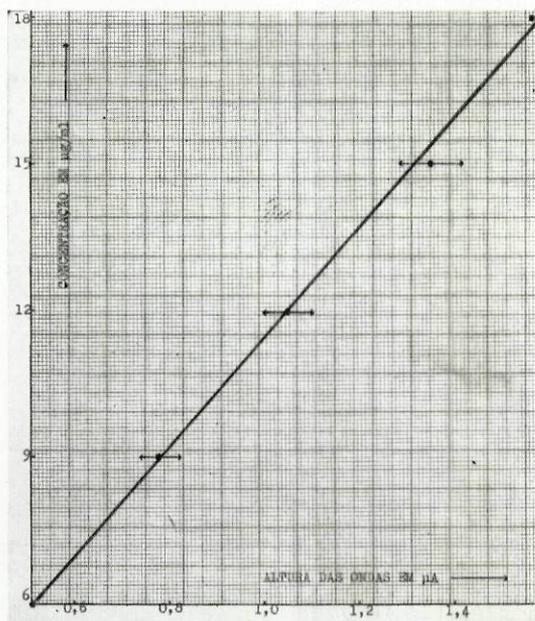


Fig. 32

Curva-padrão do formaldeído obtida com polarógrafo Sargent XXI

As concentrações de formaldeído e as alturas das respectivas ondas polarográficas, em μA , são dadas no Quadro XXXVII. De acordo com esses valores traçamos a *curva-padrão* que representamos na *figura 34*.

Sensibilidade limite e precisão:

Indicamos como sensibilidade limite de dosagem do formaldeído o valor de $0,06 \mu g/ml$, valor que comparado com o que pode ser obtido pelo método colorimétrico do ácido cromotrópico pro-

QUADRO XXXVI

Estudo estatístico da dosagem do formaldeído
empregando polarógrafo Sargent XXI

Tomada de ensaio do formaldeído $\mu g/ml$	Altura das ondas polarográficas $m\mu A$	Média das alturas das ondas pol. $m\mu A$	Erro padrão da média (s_m)	Limite de confiança a 95% $t = 2,3$	Limite relativo $\mu g/ml$
9,0	800 - 780 - 735 780 - 790 - 780 765 - 780 - 810 - 780 -	780	20,1	46,23	$9,0 \pm 0,53$
12,0	1050 - 1035 - 1080 1030 - 990 - 1080 1035 - 1020 - 1035 - 1035 -	1039	26,6	61,18	$12,0 \pm 0,70$
15,0	1350 - 1365 - 1380 1395 - 1350 - 1335 1350 - 1305 - 1305 - 1335 -	1347	30,9	71,07	$15,0 \pm 0,76$

posto por Boos (¹⁶⁶), $20 \mu g/ml$, demonstra bem as vantagens do emprego do polarógrafo de raios catódicos nesta dosagem.

A precisão e reprodutibilidade do método foram estudadas por análise estatística dos resultados obtidos na dosagem de três concentrações intermédias da *curva-padrão*. Os respectivos valo-

res do erro padrão da média, limite de confiança e limite relativo encontram-se reunidos no Quadro XXXVIII.

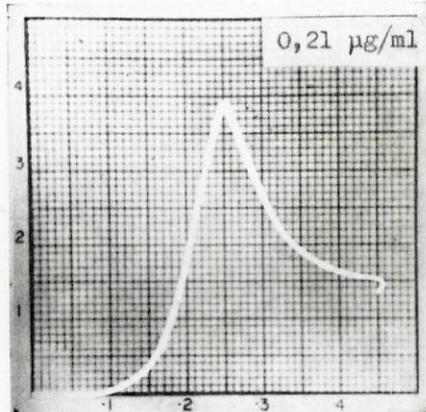
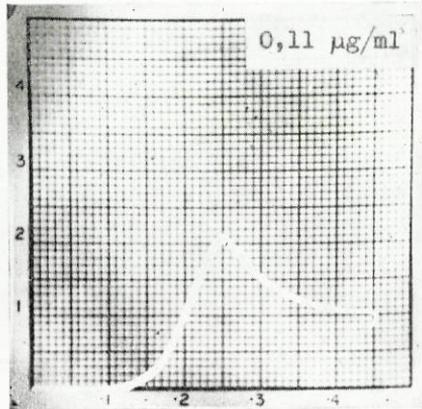


Fig. 33

Polarogramas obtidos no polarógrafo de raios catódicos para concentrações de formaldeído, respectivamente, de 0,11 $\mu\text{g/ml}$ e de 0,21 $\mu\text{g/ml}$

QUADRO XXXVII

Valores que nos serviram para o traçado da *curva-padrão* do formaldeído em polarógrafo de raios catódicos

Concentrações $\mu\text{g/ml}$	Altura das ondas polarográficas $\text{m}\mu\text{A}$	K $\text{mg/l}/\mu\text{A}$
0,06	28	—
0,11	51	2,1
0,16	73	2,2
0,21	96	2,2
0,26	119	2,1

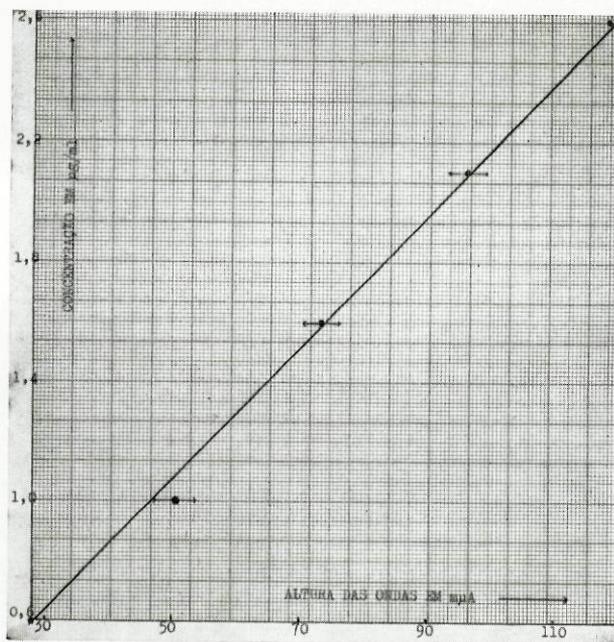


Fig. 34

Curva-padrão do formaldeído obtida com polarógrafo de raios catódicos

b) Técnica proposta para a dosagem do sulfato de di-hidro-estreptomicina

Na oxidação periódica da di-hidro-estreptomicina optámos pelo emprego de uma solução de metaperiodato de sódio, operando à temperatura ambiente, pois a libertação de formaldeído é específica para este antibiótico, mesmo em presença de estreptomicina, como já havia sido observado por GARLOCK e GROVE (75). Pudemos verificar, quanto à concentração da solução de metaperiodato de

QUADRO XXXVIII

Estudo estatístico da dosagem do formaldeído empregando polarógrafo de raios catódicos

Tomada de ensaio do antibiótico $\mu\text{g/ml}$	Altura das ondas polarográficas depois de ampliadas mm	Média das alturas das ondas pol. mm	Erro padrão da média (s_m)	Limite de confiança a 95 % $t = 2,3$	Limite relativo $\mu\text{g/ml}$
0,06	77 - 75 - 74 - 78 75 - 77 - 73 - 74 - 74 - 76 -	75,3	1,5	3,5	$0,06 \pm 0,002$
0,09	89 - 88 - 90 - 89 88 - 90 - 85 - 86 - 86 - 87 -	87,8	1,7	3,9	$0,09 \pm 0,003$
0,12	101 - 99 - 100 - 103 102 - 98 - 101 - 99 - 100 - 100 -	100,3	1,4	3,2	$0,12 \pm 0,003$

sódio, que valores inferiores a 0,02 M não libertam formaldeído quantitativamente, enquanto que concentrações superiores a 0,1 M podem originar quantidades maiores do que as provenientes de uma simples oxidação do grupo aldéidico. Esta libertação anormal do formaldeído seria explicada pelo facto da oxidação se passar de um modo mais violento, e poder, portanto, originar oxidações secundárias do antibiótico. Assim se justifica a escolha da concentração de 0,05 M para a solução de metaperiodato de sódio,

que também foi a usada no método proposto por GARLOCK e GROVE para a oxidação do mesmo antibiótico.

Já a eliminação do excesso do metaperiodato, antes da dosagem polarográfica do formaldeído libertado, é feita por precipitação deste por solução de acetato de chumbo, método que nos foi sugerido pelos trabalhos de VAIL e BRICKER (77).

A quantidade mínima de antibiótico a submeter à análise deverá estar compreendida entre 1 e 3 mg de di-hidro-estreptomicina, pois verificámos que entre estes limites a quantidade de formaldeído libertada é proporcional à concentração do antibiótico em ensaio.

Descrição do método de dosagem:

Pesa-se uma quantidade de antibiótico tal que, após diluição, origine uma solução contendo 500 a 1500 μg de sal de di-hidro-estreptomicina por ml. Medem-se 2 ml desta solução para balão aferido de 10 ml, juntam-se 2 ml de metaperiodato de sódio 0,05 M, deixando-se que a oxidação decorra por um período de 12 horas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo adicionam-se 2 ml de solução de acetato de chumbo a 0,5 %, diluindo-se a mistura resultante até ao volume de 10 ml. Finalmente, centrifuga-se o conteúdo do balão aferido a uma velocidade de cerca de 1500 r. p. m. durante 3 minutos.

A dosagem do formaldeído no centrifugado poderá ser efectuada em polarógrafo Sargent, ou de preferência, em polarógrafo de raios catódicos, segundo a técnica que anteriormente descrevemos.

Na determinação propriamente dita do antibiótico praticam-se paralelamente duas oxidações: uma sobre o antibiótico em análise, e a outra sobre igual quantidade de amostra a dosear, por estimativa, adicionada de 20 por cento de antibiótico padrão. Relacionando-se as quantidades de formaldeído determinadas, calcula-se a quantidade de antibiótico da amostra em ensaio.

Resultados:

Para se obter uma informação tão completa quanto possível sobre o rigor e reprodutibilidade do presente método, calculou-se, para uma tomada de ensaio de 2,00 mg de sulfato de di-hidro-estreptomicina, o erro padrão da média e o limite de confiança, em relação a um total de 20 determinações distintas. No Quadro XXXIX estão referidos os resultados obtidos com esse estudo estatístico.

Também, com a finalidade de melhor apreciarmos as possi-

bilidades do método foi este aplicado a três especialidades farmacêuticas contendo sulfato de di-hidro-estreptomicina (*Dihydrostreptomycine* Diamant, *Dihydrostreptomycin Sulfate* Merck e *Dihydrostreptomycin* Novo) que atrás havíamos doseado pelo método que se fundamenta na diminuição da altura do máximo polarográfico da onda do cobalto (pág. 82), praticando-se os ensaios sobre amostras pertencentes ao mesmo lote que se usou na dosagem polarográfica e microbiológica dessas especialidades farmacêuticas. Para cada especialidade executaram-se 10 determinações distintas, as quais nos serviram para estabelecer o erro padrão da média e o limite de confiança. No Quadro XL reunimos os resultados obtidos com esse estudo estatístico.

QUADRO XXXIX

Estudo estatístico referente à dosagem do sulfato de di-hidro-estreptomicina padrão por método baseado na oxidação periódica

Tomada de ensaio do antibiótico <i>mg</i>	Quantidade de antibiótico determinada após a dosagem completa <i>mg</i>	Média aritmética (<i>m</i>)	Erro padrão da média (<i>s_m</i>)	Limite de confiança a 95 % <i>t = 2,1</i>
2,00	1,995 - 2,002 - 1,975 1,980 - 2,039 - 1,974 1,943 - 1,978 - 1,930 2,060 - 1,994 - 2,030 2,005 - 1,983 - 2,048 1,976 - 1,939 - 1,931 - 1,935 - 2,003 -	1,983	0,038	2,00 ± 0,087

O confronto dos valores obtidos por este processo analítico com os resultantes do método de redução do máximo da onda do cobalto (Quadro XXVIII) e dos referidos na dosagem microbiológica (Quadro XXIX) mostra haver concordância de resultados, sendo, no entanto, os primeiros menos precisos que os baseados na redução do máximo polarográfico da onda do cobalto.

Finalmente doseámos, também, o sulfato de di-hidro-estreptomicina em especialidades farmacêuticas contendo, a par deste antibiótico, o sulfato de estreptomicina.

A dosagem da di-hidro-estreptomicina foi realizada pelo método que acabámos de descrever, exprimindo-se o resultado

da análise, para cada especialidade farmacêutica, pela média dos valores obtidos para 10 dosagens distintas, e indicando-se, ainda, os limites de confiança.

QUADRO XL

Estudo estatístico da dosagem do sulfato de di-hidro-estreptomicina em especialidades farmacêuticas, por método baseado na oxidação periódica e dosagem polarográfica do formaldeído libertado

Especialidades farmacêuticas em estudo	Actividade do antibiótico em percentagem	Média aritmética (m)	Erro padrão da média (s_m)	Limite de confiança a 95%, $t = 2,3$
<i>Dihydrostreptomycine</i> DIAMANT	98,64 - 99,02 - 98,54 98,03 - 101,34 - 99,54 99,17 - 101,96 - 102,09 - 102,65 -	100,10	1,71	100,10 \pm 3,93
<i>Dihydrostreptomycin sulfate</i> MERCK	99,73 - 100,01 - 100,48 99,10 - 102,99 - 100,20 99,65 - 103,02 - 102,36 - 103,64 -	101,12	1,60	101,12 \pm 3,68
<i>Dihydrostreptomycin</i> Novo	97,12 - 100,33 - 97,66 97,51 - 100,98 - 98,10 98,63 - 101,11 - 98,14 - 101,67 -	99,13	1,71	99,13 \pm 3,93

Descrevemos, em seguida, a composição de cada especialidade estudada (*) e os resultados analíticos obtidos, que demonstram o valor e interesse do método proposto.

Diplostrep Novo

COMPOSIÇÃO POR 20 ml:

2,5 gramas de estreptomicina-base e 2,5 gramas de di-hidro-estreptomicina-base, sob a forma de sulfatos, em solução tamponada e adicionada de conservadores.

(*) Especialidades farmacêuticas adquiridas na Suíça.

RESULTADOS DA DOSAGEM:

2,485 *gramas* de di-hidro-estreptomicina-base.
Limite de confiança — $2,485 \pm 0,095$ *gramas*.

Duo-Strep MERCK

COMPOSIÇÃO:

Sulfato de estreptomicina em quantidade equivalente a 0,5 *gramas* de estreptomicina-base.
Sulfato de di-hidro-estreptomicina em quantidade equivalente a 0,5 *gramas* de di-hidro-estreptomicina-base.

RESULTADOS DA DOSAGEM:

0,501 *gramas* de di-hidro-estreptomicina-base.
Limite de confiança — $0,501 \pm 0,020$ *gramas*.

Combistrep PFIZER

COMPOSIÇÃO:

Sulfato de di-hidro-estreptomicina em quantidade equivalente a 0,5 *gramas* de di-hidro-estreptomicina-base.
Sulfato de estreptomicina em quantidade equivalente a 0,5 *gramas* de estreptomicina-base.

RESULTADOS DA DOSAGEM:

0,510 *gramas* de di-hidro-estreptomicina-base.
Limite de confiança — $0,510 \pm 0,023$ *gramas*.

Stellamycin HOECHT

COMPOSIÇÃO:

Sulfato de estreptomicina em quantidade equivalente a 0,5 *gramas* de estreptomicina-base.
Sulfato de di-hidro-estreptomicina em quantidade equivalente a 0,5 *gramas* de di-hidro-estreptomicina-base.

RESULTADOS DA DOSAGEM:

0,496 *gramas* de di-hidro-estreptomicina-base.
Limite de confiança — $0,496 \pm 0,020$ *gramas*.

II PARTE

Dosagem de misturas de sais de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina usando a cromatografia e a electroforese em papel como métodos separativos

A) DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE SAIS DE ESTREPTOMICINA E DE DI-HIDRO-ESTREPTOMICINA RECORRENDO À CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Antes de apresentarmos uma descrição pormenorizada deste método de dosagem e os resultados obtidos com a sua aplicação a especialidades farmacêuticas contendo estreptomicina e di-hidro-estreptomicina, indicaremos as condições operatórias do processo cromatográfico empregue na separação dos referidos antibióticos.

Em princípio, o problema que nos interessou foi o da separação dos sulfatos e pantotenatos de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina com vista à dosagem individual de cada antibiótico.

Dos métodos cromatográficos propostos para a estreptomicina, a que atrás fizemos referência, mereceu-nos especial atenção o descrito por PETERSON e REINECKE (100), pois individualiza os sulfatos de estreptomicina e di-hidro-estreptomicina num tempo de desenvolvimento menor que os exigidos por outros processos cromatográficos.

Embora a adaptação desta técnica à dosagem dos referidos antibióticos não viesse resolver totalmente o problema da sua análise, pois o sulfato e o pantotenato dum mesmo antibiótico apresentam valores de R_f idênticos, procurámos introduzir algumas modificações na técnica original de separação cromatográfica, por forma a obter *manchas* tão compactas quanto possível e, também, reduzir o tempo necessário ao desenvolvimento dos cromatogramas.

Pudemos verificar, que a prévia impregnação do papel de

filtro com tampão e o emprego da técnica de *desenvolvimentos* múltiplos praticada por BRÓJO (175) na análise cromatográfica de aminoácidos neutros, origina uma melhoria nítida na separação cromatográfica destes antibióticos. Contudo, como pretendemos que o processo decorra rapidamente optámos só pela prévia impregnação do papel com tampão de *fosfato* a *pH* 3, uma vez que esta modificação da técnica original conduz a uma boa individualização dos antibióticos.

A *figura 35* é perfeitamente elucidativa, pois nela reproduzimos lado a lado dois cromatogramas que foram submetidos a condições operatórias diferentes. O cromatograma *A* corresponde a um *desenvolvimento* por 24 horas em papel não tamponado (técnica de PETERSON e REINECKE) enquanto que o cromatograma *B* foi submetido a um *desenvolvimento* por cerca de 9 horas em folha de papel tamponado a *pH* 3.

Condições operatórias do processo cromatográfico proposto

1 — *Desenvolvente*:

Ácido <i>p</i> -tolueno-sulfónico.....	2 g
<i>n</i> -Butanol saturado com água destilada (*) q. b. p.	100 ml

2 — *Padrões*:

Os sulfatos de estreptomicina e di-hidro-estreptomicina foram adquiridos na *U. S. P. Standard Reference*, tendo os pantotenatos destes dois antibióticos sido fornecidos pelo Laboratório «Chemie Grünenthal GMBH» de Stolberg — Alemanha.

Todos os antibióticos foram dissolvidos em água destilada de maneira a obterem-se soluções contendo 12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de antibiótico (**). Estas soluções poder-se-ão guardar em frigorífico, sem perda de actividade, por um mês.

3 — *Preparação das folhas de papel*:

Cortam-se folhas rectangulares de papel de filtro WHATMAN n.º 1, com as dimensões de 24 × 38 cm. Estas folhas são mergu-

(*) A saturação é feita agitando *n*-butanol com água destilada em ampola de decantação e deixando em repouso por uma noite na sala onde se procede à separação cromatográfica.

(**) As concentrações usadas foram as consideradas óptimas para uma revelação por método químico. Esta foi a preferida por ser muito mais fácil de executar que a microbiológica e satisfazer perfeitamente em ensaios qualitativos.

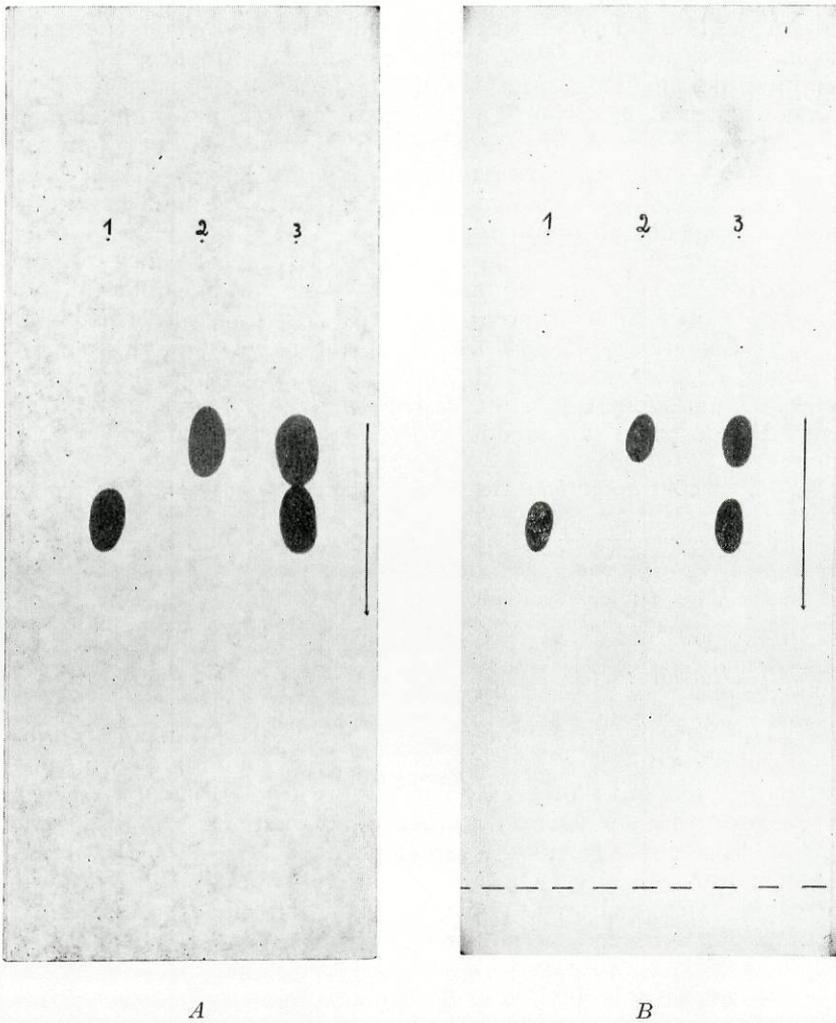


Fig. 35

Cromatogramas respeitantes ao sulfato de estreptomicina (1), sulfato de di-hidro-estreptomicina (2) e sua mistura (3)

Desenvolvente:

n-Butanol saturado com água contendo 2% de ácido *p*-tolueno-sulfônico

A — Desenvolvimento por 24 horas

B — Desenvolvimento por 9 horas

Ihadas em tampão de *fosfato* a *pH* 3 (*), depois colocadas sobre placa de vidro, retirando-se o excesso do tampão por passagem de rolo de borracha, e, finalmente, são secas com corrente de ar quente (a cerca de 50°).

Sobre estas folhas pratica-se uma dobra segundo uma linha situada a 6,5 *cm* de uma das margens mais estreitas (**) e marcam-se a 3 *cm* abaixo desta dobra 5 pontos, a lápis, com intervalos de 4 *cm*, de forma a que seja de igual distância a separação do primeiro e último ponto, relativamente às margens laterais. Finalmente, assinala-se, a tracejado, uma linha que se situará a 3 *cm* da extremidade inferior (***).

4 — Aplicação das amostras:

Nos quatro primeiros pontos foram aplicados, isoladamente por intermédio de micropipeta de escoamento total, 5 μ l de cada solução de antibiótico e no último ponto a mistura dos mesmos em idênticas concentrações (Fig. 35).

As amostras são depositadas de uma só vez, secando-se imediatamente as «manchas» com corrente de ar.

5 — Desenvolvimento dos cromatogramas:

Operações preliminares: As folhas são introduzidas nas câmaras cromatográficas (****) que foram previamente saturadas de vapor da fase móvel (*****), deixando-as em *equilíbrio* durante duas horas, antes de se iniciar o *desenvolvimento* (*****).

(*) Tampão de *fosfato* de *pH* 3:

Fosfato diácido de potássio.....	40,8 g
Ácido fosfórico a 10 %	20 ml
Água destilada q. b. p.	1000 ml

(**) Será esta a margem que se fará mergulhar na tina contendo o *desenvolvente*, destinando-se a dobra a promover a fixação da folha dentro da câmara.

(***) Linha que corresponde ao limite do *desenvolvimento*.

(****) Câmara cromatográfica tipo «20-Two-Way Chromatank» — Shandon Scientific Co.

(*****) Tendo em vista garantir uma completa saturação da atmosfera que rodeia o papel com vapores da fase móvel, revestem-se, parcialmente, as paredes da câmara cromatográfica com tiras de papel de filtro, cujas extremidades inferiores se fazem mergulhar no *desenvolvente* contido no fundo da câmara. A saturação deve ter lugar nas 24 horas que antecedem o *desenvolvimento*.

(*****) A fase móvel é vertida através de um pequeno orifício existente na tampa da câmara cromatográfica, o que evita a destruição do

Condições de desenvolvimento (*): Procede-se ao *desenvolvimento* até 3 cm da margem inferior, usando como *desenvolvente* *n*-butanol saturado com água, contendo 2% de ácido *p*-tolueno-sulfônico.

6 — *Secagem dos cromatogramas*:

Após o *desenvolvimento*, as folhas de papel de filtro, depois de retiradas das câmaras (**), são secas a 35-40°, em estufa ventilada.

7 — *Coloração dos cromatogramas*:

Se bem que o reagente de coloração contendo nitrosoferricianeto de sódio proposto por CASTEL e *col.* (118) seja um dos mais sensíveis para a revelação destes antibióticos, não pode ser usado quando se tenha empregue como *desenvolvente* *n*-butanol saturado de água contendo 2% de ácido *p*-tolueno-sulfônico. Por isso, optámos pelo reagente, que já HORNE e POLLARD (104) haviam utilizado na revelação da estreptomicina, de acordo com a seguinte técnica:

O cromatograma é pulverizado, primeiro, com solução de hidróxido de sódio N_2 e em seguida com solução alcoólica contendo 0,25% de α -naftol. Após 2 minutos sofre nova pulverização com água de Javel.

As manchas apresentam, a frio, uma coloração vermelho-viva que é pouco estável.

Resultados:

Pela observação do cromatograma representado na *figura 36*, podemos verificar a boa separação cromatográfica dos sais de estreptomicina em relação aos de di-hidro-estreptomicina.

estado de equilíbrio entre a fase gasosa e a fase líquida do *desenvolvente* e o estado de saturação do papel cromatográfico.

(*) As câmaras cromatográficas estão localizadas em sala de temperatura constante ($20^\circ \pm 1.^\circ$).

(**) Ao retirarem-se as folhas da câmara, deve ter-se o cuidado de evitar que quaisquer gotas do *desenvolvente* possam escoar da margem que mergulha na tina para a região onde se situam as *manchas*.

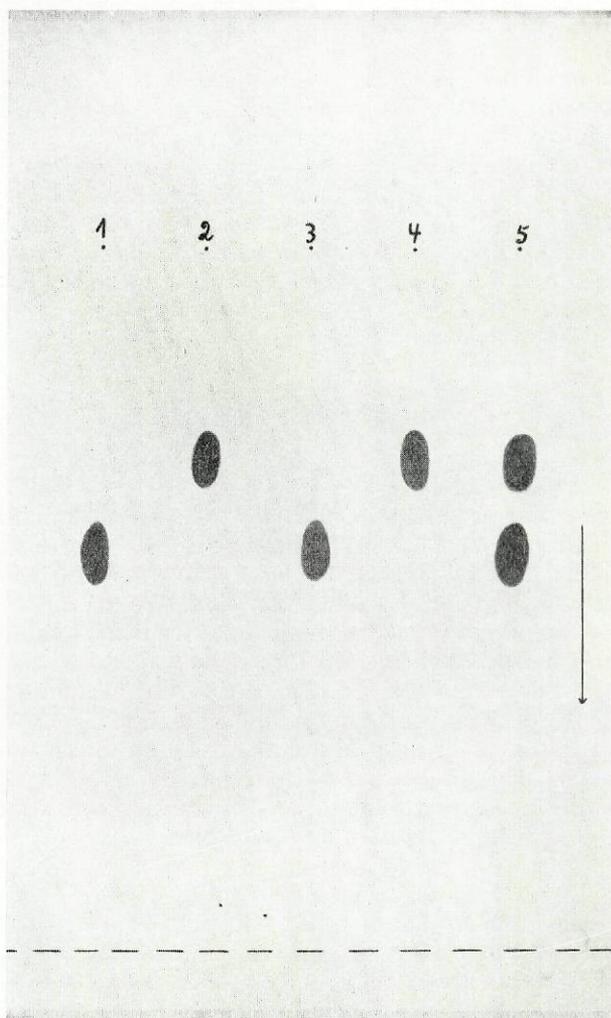


Fig. 36

Cromatograma de sais de estreptomicina
e de di-hidro-estreptomicina

Desenvolvente:

n-Butanol saturado com água, contendo 2% de ácido *p*-tolueno-sulfônico

Desenvolvimento até 3 cm da margem inferior

- 1 — Sulfato de estreptomicina
- 2 — Sulfato de di-hidro-estreptomicina
- 3 — Pantotenato de estreptomicina
- 4 — Pantotenato de di-hidro-estreptomicina
- 5 — Mistura dos quatro sais

Queremos também focar o facto de o sulfato e o pantotenato do mesmo antibiótico possuírem idêntico valor de *Rf*, aparecendo, portanto, juntos na mistura dos quatro sais.

Em face desta observação, é lógico concluir que o ácido *p*-tolueno-sulfónico ao reagir com os sais de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina formará *p*-tolueno-sulfonatos, motivo porque no final do *desenvolvimento* cromatográfico, em relação a um dado antibiótico, se obtêm *manchas* com o mesmo valor de *Rf*.

*

*

*

Se bem que a dosagem dos sais de estreptomicina nunca fosse realizada por cromatografia em papel, já o mesmo não aconteceu com as penicilinas. A determinação quantitativa por cromatografia em papel de penicilinas foi efectuada pela primeira vez por GOODALL e LEVI ⁽¹⁷⁶⁾, sendo esta técnica modificada posteriormente por GLISTER e GRAINGER ⁽¹⁷⁷⁾.

Sem nos determos em grandes pormenores, iremos destacar as diferenças essenciais entre o método inicial de GOODALL e LEVI e a técnica de dosagem proposta mais tarde por GLISTER e GRAINGER, processos em que nos baseámos para a elaboração de uma técnica de dosagem microbiológica de misturas de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina depois da sua separação cromatográfica.

Na determinação quantitativa dos tipos mais correntes de penicilina, GOODALL e LEVI fizeram, em primeiro lugar, a sua separação cromatográfica em tiras de papel de filtro, e procederam, depois, à dosagem de cada antibiótico, colocando os cromatogramas sobre meio de cultura semeado de *B. subtilis* e medindo, após incubação a 37°, os diâmetros das zonas de inibição.

Estes Autores verificaram que o diâmetro das zonas de inibição para um dado antibiótico é proporcional ao logaritmo da respectiva concentração, tendo ainda indicado três técnicas que podem ser usadas neste tipo de dosagem:

— Comparar as zonas de inibição da amostra com as zonas obtidas a partir de misturas-padrões de penicilina.

— Relacionar as zonas de inibição do antibiótico em análise, depois do *desenvolvimento*, com as zonas do antibiótico padrão não submetido ao processo cromatográfico. Das experiências realizadas

puderam estabelecer o factor 1,2, que relaciona as *manchas* antes e depois do *desenvolvimento* cromatográfico.

— Fazer uma série de diluições e da própria amostra do padrão, submetendo um dado volume de cada diluição ao processo cromatográfico; verificar depois, as diluições que já não dão zonas de inibição. Esta variante, segundo a opinião dos Autores, não poderá ser considerada como método de dosagem, mas servirá, principalmente, para dar indicações sobre uma maior ou menor actividade da amostra.

Embora os referidos Autores tivessem obtido resultados satisfatórios com os dois primeiros métodos, GLISTER e GRAINGER modificaram o primeiro com o fim de o tornar mais preciso e de mais fácil execução. Para isso, além das modificações no processo cromatográfico (*) usaram somente duas concentrações dos padrões de penicilina G e K (5000 U. I. e 50 U. I.), isto porque haviam verificado que entre as referidas concentrações a largura máxima da zona de inibição era uma função linear do logaritmo das unidades de penicilina aplicada.

*

*

*

O emprego deste último método à dosagem de sais de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina mostrou-nos que os resultados não eram inteiramente reprodutíveis, o que nos levou a averiguar, em primeiro lugar, até que ponto a largura máxima das zonas de inibição era uma função linear do logaritmo da concentração.

Um estudo mais profundo sobre este assunto permitiu-nos concluir que a linearidade, para as concentrações usadas, era mais exacta quando, a *curva-padrão* se estabelece não em função dos diâmetros das zonas de inibição, mas sim tomando como base a média (Z) entre os comprimentos dos eixos maior (E) e menor (e) dessas zonas de inibição (**).

(*) Empregam tiras de papel de filtro impregnadas de tampão de fosfato a pH 6,2, usando como dose mais baixa de penicilina, na parte qualitativa, o valor de 5 U. I. em vez da concentração de 30 U. I. aplicada no método de GOODALL e LEVI. O *desenvolvimento* das tiras com éter dietílico saturado com água é muito mais rápido (2 a 3 horas) decorrendo à temperatura ambiente, enquanto que no método inicial o *desenvolvimento* era executado a 4° por cerca de 24 horas.

(**) As zonas de inibição obtidas a partir dos cromatogramas são de aspecto elíptico e daí se obterem melhores resultados, em relação à

No Quadro XLI indicam-se as médias dos valores de Z (*) obtidos, num total de 10 ensaios distintos, com diferentes concentrações de sulfato de estreptomina e de di-hidro-estreptomina. Esses mesmos valores serviram-nos para o traçado da *curva-padrão* de cada antibiótico, representadas na *figura 37*.

Método proposto para a dosagem dos sais de estreptomina e de di-hidro-estreptomina utilizando a cromatografia em papel como método separativo

Ao estudarmos a técnica mais apropriada para a separação de sais de estreptomina e de di-hidro-estreptomina por cromatografia em papel verificámos ser possível separar os sulfatos de estreptomina e di-hidro-estreptomina, bem como a mistura dos respectivos pantotenatos.

QUADRO XLI

Valores usados na obtenção das *curvas-padrões* do sulfato de estreptomina e do sulfato de di-hidro-estreptomina

SULFATO DE ESTREPTOMICINA		SULFATO DE DI-HIDRO-ESTREPTOMICINA	
Quantidade de antibiótico aplicada em cada cromatograma <i>µg</i>	Média dos valores de Z (*) em décimos de <i>mm</i> (10 ensaios)	Quantidade de antibiótico aplicada em cada cromatograma <i>µg</i>	Média dos valores de Z (*) em décimos de <i>mm</i> (10 ensaios)
0,5	165	0,5	169
0,9	208	0,9	209
1,3	214	1,3	212
1,7	228	1,7	224
2,1	245	2,1	238
2,5	254	2,5	248

linearidade da *curva-padrão*, quando se considera a média entre o comprimento dos dois eixos.

(*)

$$\frac{E+e}{2} = Z$$

Em virtude de se formarem sais do ácido *p*-tolueno-sulfônico durante o *desenvolvimento* cromatográfico, o sulfato e o pantotenato do mesmo antibiótico apresentam um deslocamento idêntico. Assim, esta técnica cromatográfica só poderá ser aplicada

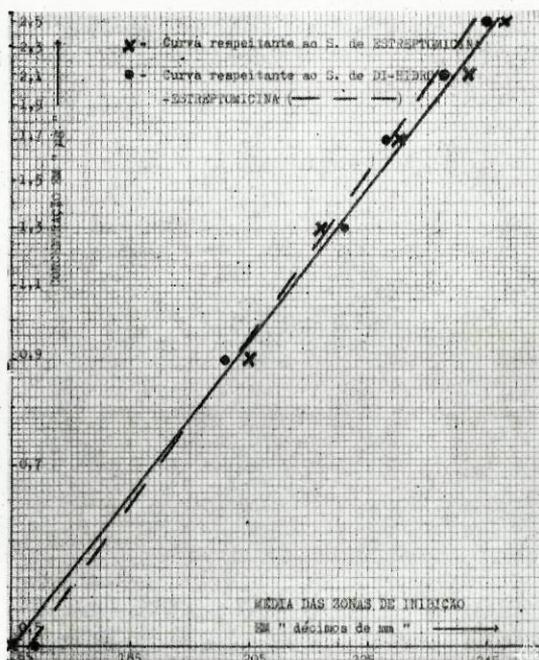


Fig. 37

Curvas-padrões de sulfato de estreptomicina e de sulfato de di-hidro-estreptomicina representando a média dos valores de Z (*) em função das concentrações

a misturas de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina, desde que nestas não exista concomitantemente o sulfato e o pantotenato do mesmo antibiótico.

Ao pretendermos dosar uma mistura destes antibióticos desenvolver-se-ão, paralelamente, duas soluções da amostra em concentrações convenientes e duas do padrão para cada antibiótico

(*) Ver nota (*) da página anterior.

a dosear. Devem preparar-se um mínimo de quatro cromatogramas que deverão *desenvolver-se* tanto quanto possível em condições idênticas, de preferência na mesma câmara cromatográfica. Após o *desenvolvimento* os cromatogramas são colocados, depois de secos, sobre placas contendo meio de cultura apropriado, nas quais depois de incubação, são medidas as zonas de inibição respeitantes a cada antibiótico da mistura e do padrão. A percentagem de actividade (X) de cada antibiótico pode ser calculada pela seguinte expressão:

$$X = \text{antilog} \left(2 + \frac{(Z_A + Z_a) - (Z_S + Z_s)}{(Z_S + Z_A) - (Z_s + Z_a)} \times \log d \right)$$

em que,

- Z_A e Z_a — Médias dos valores de Z (*) obtidos com a amostra do antibiótico a dosear, respectivamente nas concentrações maior e menor.
 Z_S e Z_s — Médias dos valores de Z obtidos com o padrão, respectivamente nas concentrações maior e menor.
 d — Relação entre as concentrações maior e menor.

Com a finalidade de se poder dar uma revisão de conjunto do método proposto e uma indicação mais completa da sua precisão e reprodutibilidade, praticámos a análise quantitativa de uma mistura de composição conhecida que é submetida a todas as fases operatórias do processo, indicando-se depois os resultados obtidos com a dosagem de três especialidades farmacêuticas contendo sulfatos de estreptomina e de di-hidro-estreptomina.

1 — Ensaio de prova

Misturas-testemunho e padrões:

As misturas-testemunho bem como as soluções padrões são obtidas por dissolução dos antibióticos em água destilada, nas seguintes concentrações:

Mistura 1:		
	Sulfato de estreptomina	48 mg/100 ml
	Sulfato de di-hidro-estreptomina	48 mg/100 ml

(*) Ver nota (*) da página 126.

Mistura 2:		
Sulfato de estreptomicina	12 mg/100 ml	
Sulfato de di-hidro-estreptomicina	12 mg/100 ml	
Padrão A:		
Sulfato de estreptomicina	48 mg/100 ml	
Padrão B:		
Sulfato de estreptomicina	12 mg/100 ml	
Padrão C:		
Sulfato de di-hidro-estreptomicina	48 mg/100 ml	
Padrão D:		
Sulfato de di-hidro-estreptomicina	12 mg/100 ml	

Separação cromatográfica ():*

Empregam-se quatro folhas de papel de filtro WHATMAN n.º 1 com as dimensões de 35,5 × 39,5 cm que foram previamente tamponadas com solução de fosfato a pH 3,0. Em cada folha faz-se uma dobra a 6,5 cm de uma das margens mais estreitas, e marcam-se a lápis, a 3 cm abaixo desta dobra, 6 pontos com intervalos de 5,5 cm, por forma a que a distância de separação do primeiro e último ponto relativamente às margens laterais, seja de 4 cm. Assinala-se a tracejado uma segunda linha transversal disposta a 3 cm da extremidade inferior.

Aplicação das amostras:

Aplica-se em cada folha, de acordo com o diagrama representado na figura 38, por intermédio de micropipeta, 5 µl das seguintes soluções:

Padrão A.....	Ponto 1
Padrão C.....	» 2
Mistura 1.....	» 3
Mistura 2.....	» 4
Padrão B.....	» 5
Padrão D.....	» 6

Desenvolvimento dos cromatogramas:

Manteve-se a técnica de *desenvolvimento*, que descrevemos nas condições operatórias do processo cromatográfico proposto

(*) Para mais pormenores do processo cromatográfico ver página 119.

(pág 119), tendo-se, de igual modo, submetido os cromatogramas a um *desenvolvimento* até 3 cm da margem inferior.

Secagem e lavagem dos cromatogramas:

Após o *desenvolvimento*, secam-se as folhas a 35-40° em estufa ventilada. Para uma perfeita eliminação do *desenvolvente* as

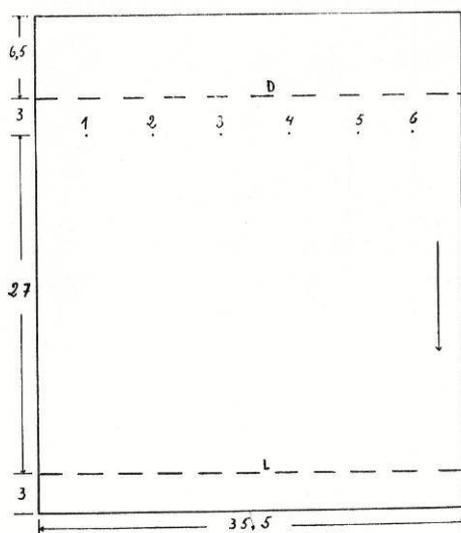


Fig 38

Diagrama das folhas a *desenvolver*
na dosagem de sais de estreptomicina
e de di-hidro-estreptomicina

D — Dobra de suspensão
L — Limite do *desenvolvente*

folhas deverão ser lavadas (*), por imersão em éter, sendo depois secas com ventilação.

(*) A lavagem dos cromatogramas com éter, eliminando os vestígios do *desenvolvente* que tivesse ficado retido no cromatograma, evita a sua interferência na técnica microbiológica.

Dosagem microbiológica dos antibióticos cromatografados:

a) Preparação das placas com o meio de cultura

Utilizam-se placas quadradas constituídas por uma base em vidro com as dimensões de $40,5 \times 40,5$ cm, sobre as quais se dispõem, formando caixilho, 4 lâminas em vidro de 38 cm de comprimento, 2,5 cm de largura, das quais duas com 8 mm de espessura e as outras com 9 mm (*). Estas lâminas de vidro são fixadas à base por intermédio de fita adesiva. As tampas das placas, também em vidro, possuem as mesmas dimensões da base.

Os diferentes elementos das placas são esterilizados separadamente em estufa e depois de se fixarem as lâminas às placas, o conjunto é de novo esterilizado pela acção dos raios ultravioletas.

Uma vez que o fundo das placas é perfeitamente plano não há qualquer vantagem em colocar nele uma camada de meio de base pelo que o meio de cultura, depois de semeado com suspensão de esporos da estirpe de *B. subtilis* A. T. C. C. 6633, é vertido para as placas que se encontram dispostas horizontalmente (**).

Para a preparação da suspensão de esporos de *B. subtilis* procedemos de modo análogo ao descrito no método microbiológico usado para o sulfato de estreptomicina a quando do estudo comparativo dos métodos polarográfico e microbiológico (pág. 56).

A diluição final da suspensão é feita de modo que, ao ser examinada em fotómetro, numa tina de 1 cm de espessura com filtro verde, apresente uma transmissão de 40 %. Adicionamos 1 ml desta suspensão a 150 ml do meio de cultura (***) a verter nas placas e aquecido a 55-60°. Deve-se, antes de verter a totalidade do meio, adicionar cerca de 25 ml deste sobre os ângulos formados pelas lâminas de vidro e a base, de modo a obter-se uma vedação

(*) As lâminas são dispostas de maneira a ficarem, as da mesma espessura, em face uma da outra, para que assim a tampa, não se ajustando perfeitamente, permita o arejamento da cultura.

(**) As placas são colocadas sobre uma chapa de vidro espessa que é suportada por três pés, dois dos quais providos de parafuso, pelo que assim pode ser perfeitamente nivelada.

(***)	Peptona.....	6	g
	Extracto de levedura	3	g
	Extracto de carne	1,5	g
	Gelosa	15	g
	Água destilada q. b. p.	1000	ml

O pH é ajustado a 8,0 após a esterilização.

sumária. Com a junção do restante meio (350 ml) obtém-se, nas placas, uma camada de cerca de 3 mm de espessura.

Depois da solidificação do meio e de convenientemente arrefecido, as placas poderão ser guardadas em frigorífico até ao seu emprego.

b) Dosagem própria dita

Os cromatogramas são cortados na extremidade superior e inferior, de modo a retirar a cada, duas tiras de 7 cm de largura. Estas folhas contendo os antibióticos já separados são aplicadas à superfície das placas de gelosa de maneira a que não fiquem interpostas bolhas de ar. Deixamos contactar as folhas por um período de 10 minutos, ao fim do qual estas são retiradas, sendo, depois das caixas tapadas, levadas à estufa a 37° por 12 horas (*).

A apreciação das zonas de inibição, que se formam após incubação, é feita determinando a média do comprimento dos dois eixos (*Z*), em décimos de milímetro. Na *figura 39* reproduzimos o aspecto de um autobiograma obtido nesta dosagem, e que foi traçado delimitando as zonas de inibição, directamente da placa, sobre papel transparente.

No Quadro XLII mencionamos os valores de *Z* (média entre o comprimento dos eixos maior e menor das zonas de inibição) respeitantes aos padrões e à mistura-testemunho.

A actividade dos antibióticos da mistura-testemunho, que submetemos ao processo cromatográfico, foi determinada de acordo com a expressão atrás indicada (*pág. 128*).

O cálculo da actividade dos dois antibióticos, em percentagem, forneceu os seguintes resultados:

Sulfato de estreptomicina.....	96,0
Sulfato de di-hidro-estreptomicina	95,2

Para se obter uma indicação mais completa sobre o rigor e reprodutibilidade da dosagem, determinou-se, para mais três ensaios, o limite de confiança de cada determinação, referente aos sulfatos de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina. (Quadro XLIII).

(*) A estufa deve possuir uma humidade relativa de cerca de 70 %, que pode ser conseguida dispondo nesta um cristalizador com água.

2 — Aplicação do método à dosagem de especialidades farmacêuticas contendo sulfatos de estreptomicina e di-hidro-estreptomicina

O método que acabámos de descrever foi também aplicado à dosagem de especialidades farmacêuticas (*) contendo sulfato de

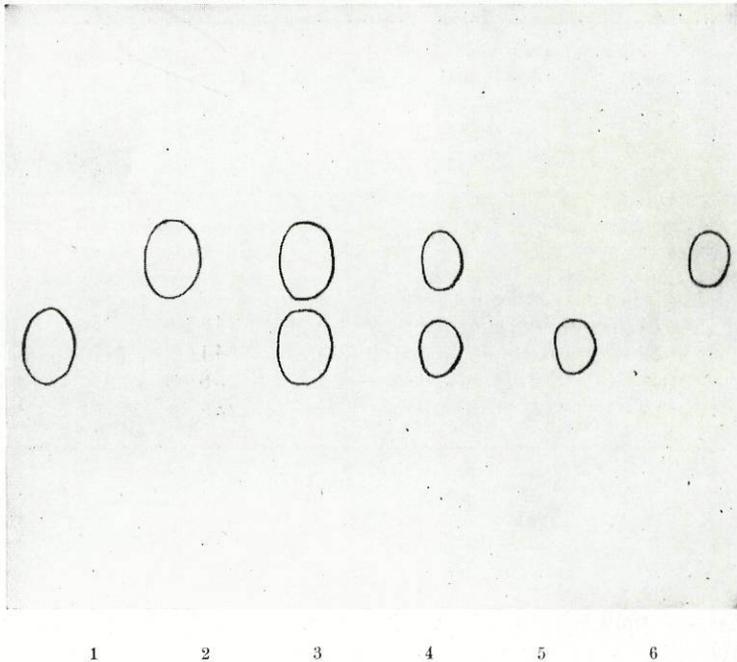


Fig. 39

Reprodução em papel transparente de um autobiograma respeitante à dosagem do sulfato de estreptomicina e do sulfato de di-hidro-estreptomicina por cromatografia em papel

- 1 — Sulfato de estreptomicina (2,4 μg)
- 2 — Sulfato de di-hidro-estreptomicina (2,4 μg)
- 3 — Mistura dos dois antibióticos na dose maior
- 4 — Mistura dos dois antibióticos na dose menor
- 5 — Sulfato de estreptomicina (0,6 μg)
- 6 — Sulfato de di-hidro-estreptomicina (0,6 μg)

(*) Especialidades que já havíamos doseado por método polarográfico (pág. 116).

QUADRO XLII

Valores de Z, em décimos de milímetro, respeitantes aos padrões e mistura-testemunho dos sulfatos de estreptomicina e di-hidro-estreptomicina (método cromatográfico)

PADRÕES				MISTURA-TESTEMUNHO			
Sulfato de estreptomicina		Sulfato de di-hidro-estreptomicina		Dose maior (2,4 μg)		Dose menor (0,6 μg)	
Dose maior (2,4 μg)	Dose menor (0,6 μg)	Dose maior (2,4 μg)	Dose menor (0,6 μg)	Sulfato de estrepto.	Sulfato de di-hidro.	Sulfato de estrepto.	Sulfato de di-hidro.
252	174	258	178	248	248	175	176
246	176	262	172	260	244	166	172
256	180	256	176	252	256	167	174
250	176	250	178	250	258	176	180

QUADRO XLIII

Valores dos limites de confiança ($t=2,18$, $P=95\%$), em percentagem de actividade, respeitantes a 4 dosagens distintas da mistura-testemunho contendo os dois antibióticos (método cromatográfico)

SULFATO DE ESTREPTOMICINA		SULFATO DE DI-HIDRO-ESTREPTOMICINA	
Valor máximo	Valor mínimo	Valor máximo	Valor mínimo
108,6	92,07	109,0	91,75
110,4	90,58	109,9	90,99
109,2	91,57	111,2	89,93
109,8	91,07	110,6	90,41

estreptomicina e sulfato de di-hidro-estreptomicina, indicando-se para cada uma os resultados analíticos obtidos, expressos em percentagem de actividade, assim como o limite de confiança para cada determinação.

Diplostrep NOVO

COMPOSIÇÃO POR 20 ml:

2,5 gramas de estreptomicina-base e 2,5 gramas de di-hidro-estreptomicina-base, sob a forma de sulfatos, em solução tamponada e adicionada de conservadores.

RESULTADOS DA DOSAGEM:

Actividade do sulfato de estreptomicina em percentagem — 98,04.
Limite de confiança: 89,03 — 112,3.
Actividade do sulfato de di-hidro-estreptomicina em percentagem — 89,71. Limite de confiança: 86,47 — 115,6.

Duo-Strep MERCK

COMPOSIÇÃO:

Sulfato de estreptomicina em quantidade equivalente a 0,5 gramas de estreptomicina-base.
Sulfato de di-hidro-estreptomicina em quantidade equivalente a 0,5 gramas de di-hidro-estreptomicina-base.

RESULTADOS DA DOSAGEM:

Actividade do sulfato de estreptomicina em percentagem — 100,9.
Limite de confiança: 88,20 — 113,4.
Actividade do sulfato de di-hidro-estreptomicina em percentagem — 86,35. Limite de confiança: 86,06 — 116,2.

Combistrep PFIZER

COMPOSIÇÃO:

Sulfato de di-hidro-estreptomicina em quantidade-equivalente a 0,5 gramas de di-hidro-estreptomicina-base.
Sulfato de estreptomicina em quantidade equivalente a 0,5 gramas de estreptomicina-base.

RESULTADOS DA DOSAGEM:

Actividade do sulfato de estreptomicina em percentagem — 110,3.
Limite de confiança: 87,62 — 114,1.
Actividade do sulfato de di-hidro-estreptomicina em percentagem 95,85. Limite de confiança: 87,95 — 113,7.

Stellamycin HOECHT

COMPOSIÇÃO:

Sulfato de estreptomicina em quantidade equivalente a 0,5 *gramas* de estreptomicina-base.

Sulfato de di-hidro-estreptomicina em quantidade equivalente a 0,5 *gramas* de di-hidro-estreptomicina-base.

RESULTADOS DA DOSAGEM:

Actividade do sulfato de estreptomicina em percentagem — 108,4.

Limite de confiança: 87,10 — 103,7.

Actividade do sulfato de di-hidro-estreptomicina em percentagem — 98,94.

Limite de confiança: 85,96 — 106,4.

B) DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE SAIS
DE ESTREPTOMICINA E DE DI-HIDRO-ESTREPTOMICINA
RECORRENDO À ELECTROFORESE EM PAPEL

Pudemos verificar, por cromatografia em papel, ser possível separar de uma mistura de sulfatos de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina ou de pantotenatos dos mesmos antibióticos, cada um dos componentes, mas nunca individualizar a mistura dos quatro sais. Deste modo, dado que tínhamos interesse num processo analítico capaz de ser aplicado a este tipo de associações, prestou-nos valioso auxílio a electroforese em papel na separação destes sais. Para a sua dosagem subsequente usámos o método microbiológico já descrito no processo anterior.

A separação electroforética foi estudada tendo em conta as técnicas de electroforese propostas para a estreptomicina, di-hidro-estreptomicina e substâncias afins que descrevemos com certo pormenor nas páginas anteriores, em particular, as de FOSTER e ASHTON ⁽¹¹¹⁾ e as de PHILIPPE e *col.* ⁽¹¹⁷⁾.

Seguindo a orientação dada na determinação destes antibióticos por cromatografia em papel, iremos estabelecer, também, as condições electroforéticas empregues na separação dos sulfatos e pantotenatos de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina, antes de descrevermos o processo quantitativo.

Condições operatórias do processo electroforético proposto

Aparelho de electroforese:

A câmara electroforética utilizada, sistema de KUNKEL e TISELIUS ⁽¹¹⁴⁾, é constituída por dois vasos electródicos de grande

capacidade (cerca de 1000 ml) (*) que suportam além de duas caixas em cobre onde circula água termoestabilizada (**), duas placas de vidro siliconadas (***) entre as quais se dispõe a folha de papel de filtro (****) a submeter à electroforese.

Como fonte de corrente contínua utilizámos o aparelho comercial «SPINCO DUOSTAT» fabricado pela *Beckman Instruments Inc.* (U. S. A.) (****) que permite manter constante o valor do potencial ou da intensidade de corrente, consoante o fim em vista.

Electrólito de fundo:

Tampão de borato a pH 8,6 com a seguinte composição:

Borato de sódio	5,24 g
Ácido bórico	40,00 g
Água destilada q. b. p.	1000 ml

Padrões:

Os quatro sais são de origem idêntica à indicada no processo cromatográfico anteriormente descrito.

Os padrões foram obtidos por dissolução destes sais em água destilada de modo a obterem-se soluções na concentração de 4 µg/µl.

- Padrão 1 — Solução de sulfato de estreptomicina
- Padrão 2 — Solução de pantotenato de estreptomicina
- Padrão 3 — Solução de sulfato de di-hidro-estreptomicina
- Padrão 4 — Solução de pantotenato de di-hidro-estreptomicina

(*) Os vasos eléctricos possuindo três tabiques mantêm os líquidos em que mergulham, respectivamente, as extremidades da folha de papel e os eléctrodos, praticamente separados.

(**) Estas caixas de cobre asseguram um arrefecimento conveniente, de tal modo que podemos dizer que o processo electroforético decorre a temperatura constante, ocasionando, assim, um mínimo de sobreaquecimento da folha de papel de filtro.

(***) Para a siliconagem das placas de vidro procede-se do seguinte modo: Em primeiro lugar lavam-se as placas de preferência com detergente, de modo a ficarem sem vestígios de gordura. Depois, aplicam-se sobre as faces a siliconar, algumas gotas de Desicote 18772 (*New Desicote*), produto da *Beckman Instruments Inc.*, que se espalham perfeitamente. Finalmente, faz-se uma lavagem rápida com acetona que retira o excesso de silicone.

(****) O contacto eléctrico entre as extremidades da folha de papel e o electrólito é assegurado por tiras de papel de filtro muito poroso.

(*****) *Spinco — Beckman Instruments Inc.* Belmont, California.

Preparação das folhas de papel e aplicação das amostras:

Usámos folhas de papel de filtro WHATMAN n.º 1, com as dimensões de 34×45 cm dobrando-se de cada lado, segundo uma linha situada a 5 cm de uma das margens mais estreitas; a 10 cm dessa mesma extremidade marcam-se, a lápis, 5 pontos intervalados de 5 cm, de modo que a distância do primeiro e último pontos, em relação às margens laterais do papel, seja de 7 cm.

Nos quatro primeiros pontos foram aplicados, isoladamente, 5 μ l de cada padrão e no último ponto a mistura dos quatro sais (Fig. 40).

Preparação dos electroforegramas:

Operações preliminares:

Borrifa-se o papel com o electrólito de fundo até cerca de 2 cm da linha dos pontos de aplicação, deixando assim, uma zona seca intermediária, que será humedecida apenas no momento em que a folha se introduz na câmara electroforética.

Coloca-se a folha entre as placas de vidro tendo o cuidado de não deixar bolhas de ar interpostas e que as dobras daquela coincidam com os bordos das placas (*). Dispõe-se o conjunto sobre a caixa de refrigeração inferior de modo que a extremidade do papel mais próxima dos pontos de aplicação, se situe do lado do polo negativo. Adapta-se, em seguida, a caixa de refrigeração superior e aguarda-se cerca de 15 minutos, antes de ligar a corrente eléctrica.

Condições da electroforese:

Aplica-se uma tensão de 350 volts, durante 6 horas, fazendo circular uma corrente de água termoestabilizada a 20º (temperatura ambiente) nas caixas de refrigeração.

Secagem das folhas e coloração com o reagente nitrosoferri-cianeto de sódio proposto por CASTEL e col.:

A revelação foi executada com o reagente, não sensibilizado, descrito na página 24.

Resultados

A observação do electroforegrama reproduzido na *figura 40* mostra a boa separação electroforética dos sais de estreptom-

(*) Deve-se aplicar uma camada delgada de *gordura* de silicone nas extremidades das placas de vidro não adjacentes aos vasos electródicos. Este revestimento evita a evaporação lateral na folha de papel de filtro, melhorando, deste modo, a separação electroforética.

cina e de di-hidro-estreptomicina, o que nos permitiu a aplicação do método microbiológico à dosagem de cada substância antibiótica.

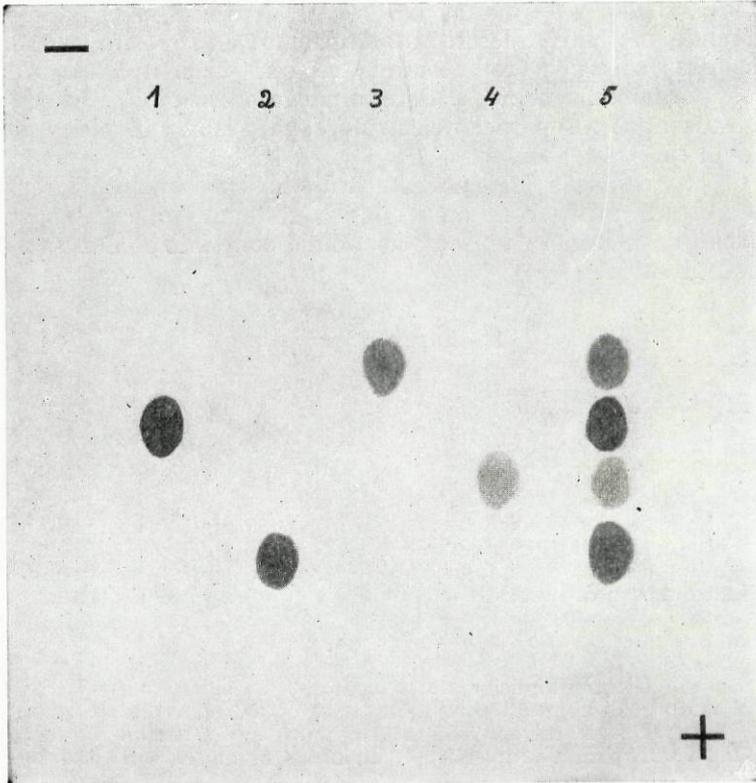


Fig. 40

Electroforegrama de sais de estreptomicina
e de di-hidro-estreptomicina

Electrólito de *fundo*: Tampão de borato a pH 8,6

Tensão nos eléctrodos: 350 volts

Tempo de separação: 6 horas

- 1 — Sulfato de estreptomicina
- 2 — Sulfato de di-hidro-estreptomicina
- 3 — Pantotenato de estreptomicina
- 4 — Pantotenato de di-hidro-estreptomicina
- 5 — Mistura dos quatro sais

Método proposto para a dosagem dos sais de estreptomicina
e de di-hidro-estreptomicina utilizando a electroforese
em papel como método separativo

Tendo presente a descrição que fizemos a propósito da dosagem destes sais por cromatografia, não se torna necessário dar outros pormenores sobre a determinação microbiológica que é executada após a separação electroforética, visto a técnica usada ser idêntica.

Como conclusão lógica a este trabalho experimental faremos um ensaio de prova com uma mistura-testemunho, bem como a aplicação do método a uma especialidade contendo os dois sais de cada antibiótico

1 — Ensaio de prova

Misturas-testemunho e padrões:

Mistura 1:

Sulfato de estreptomicina	80 mg/100 ml (Padrão A)
Sulfato de di-hidro-estreptomicina	80 mg/100 ml (Padrão B)
Pantotenato de estreptomicina	80 mg/100 ml (Padrão C)
Pantotenato de di-hidro-estreptomicina	80 mg/100 ml (Padrão D)

Mistura 2:

Sulfato de estreptomicina.....	20 mg/100 ml (Padrão E)
Sulfato de di-hidro-estreptomicina	20 mg/100 ml (Padrão F)
Pantotenato de estreptomicina	20 mg/100 ml (Padrão G)
Pantotenato de di-hidro-estreptomicina	20 mg/100 ml (Padrão H)

Aplicação das amostras:

Depositámos na folha de papel de filtro WHATMAN n.º 1 (34 × 45 cm), de acordo com o esquema indicado na figura 41, por intermédio de micropipeta de escoamento total, 2,5 μ l de cada solução padrão e das soluções misturas-testemunho.

Dosagem microbiológica dos antibióticos após separação electroforética:

A dosagem é efectuada, em quatro electroforegramas obtidos em condições idênticas, por técnica microbiológica igual à usada

na determinação quantitativa dos cromatogramas respeitantes aos sulfatos de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina.

No Quadro XLIV mencionamos os valores de Z (*) referentes aos padrões e misturas-testemunho.

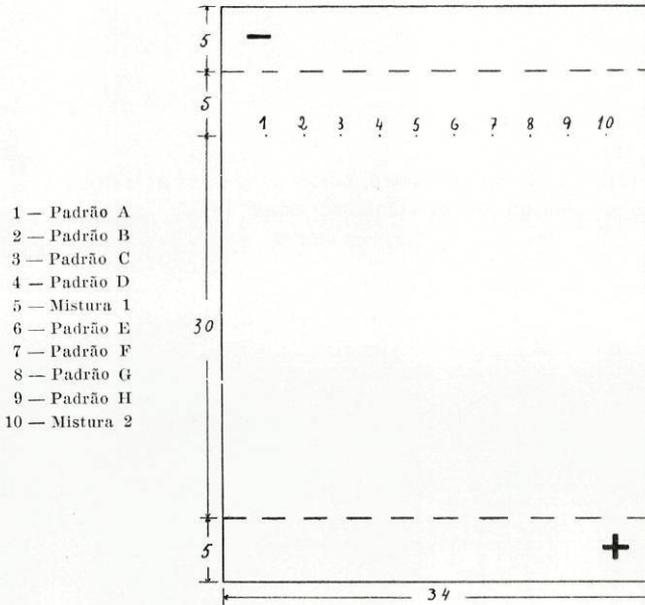


Fig. 41

Diagrama da folha a submeter à electroforese de sais de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina (determinação quantitativa)

Nota -- As linhas a tracejado correspondem às dobras que delimitam as extremidades do papel que mergulham no electrólito.

Tendo em conta a expressão que nos serviu para determinar a actividade dos antibióticos nos ensaios precedentes, calculámos,

(*) Z — Valor correspondente à média entre os comprimentos dos eixos maior e menor das zonas de inibição.

em percentagem, a actividade dos sais da presente mistura-testemunho:

Sulfato de estreptomicina — 94,07.
 Sulfato de di-hidro-estreptomicina — 96,86.
 Pantotenato de estreptomicina — 92,52.
 Pantotenato de di-hidro-estreptomicina — 98,20.

QUADRO XLIV

Valores de Z, em décimos de milímetro, correspondentes ao conjunto dos quatro electroforegramas

PADRÕES							
Sulfato de estreptomicina		Sulfato de di-hidro-estreptomicina		Pantotenato de estreptomicina		Pantotenato de di-hidro-estreptomicina	
Dose maior (2,0 μg)	Dose menor (0,5 μg)	Dose maior (2,0 μg)	Dose menor (0,5 μg)	Dose maior (2,0 μg)	Dose menor (0,5 μg)	Dose maior (2,0 μg)	Dose menor (0,5 μg)
222	152	220	150	220	137	216	144
230	146	226	154	212	141	209	140
226	156	238	146	214	150	227	132
238	160	236	143	226	146	226	132

MISTURA-TESTEMUNHO							
Dose maior				Dose menor			
Sulfato de estreptomicina	Sulfato de di-hidro-estrepto.	Pantotenato de estreptomycinina	Pantotenato de di-hidro-estrepto.	Sulfato de estreptomicina	Sulfato de di-hidro-estrepto.	Pantotenato de estreptomycinina	Pantotenato de di-hidro-estrepto.
218	228	206	210	146	148	131	144
225	220	215	216	147	152	144	134
230	226	219	218	155	140	145	100
227	230	218	220	150	154	134	144

Com a finalidade de melhor se poder apreciar a reprodutibilidade e precisão deste processo analítico, indicamos o limite de confiança para mais três dosagens completas da mistura-testemunho (Quadro XLV).

QUADRO XLV

Valores dos limites de confiança ($t = 2,18$, $P = 95\%$), em percentagem de actividade, respeitantes a 4 dosagens distintas da mistura-testemunho contendo os 4 sais (método electroforético)

SULFATO DE ESTREPTOMICINA		SULFATO DE DI-HIDRO-ESTREPTOMICINA	
Valor máximo	Valor mínimo	Valor máximo	Valor mínimo
113,5	88,91	112,6	88,78
117,5	85,10	117,0	85,44
115,8	86,37	115,6	86,48
115,0	86,90	116,5	85,85

PANTOTENATO DE ESTREPTOMICINA		PANTOTENATO DE DI-HIDRO-ESTREPTOMICINA	
Valor máximo	Valor mínimo	Valor máximo	Valor mínimo
113,3	88,25	113,1	88,44
114,5	87,33	114,2	87,60
116,5	85,83	116,0	86,20
117,3	87,24	116,1	86,35

2 — Aplicação à dosagem de especialidades farmacêuticas

A especialidade farmacêutica que a seguir indicamos representa um dos exemplos mais típicos da associação dos dois derivados da estreptomina com os outros dois da di-hidro-estreptomina. Outras especialidades existem em que o problema está

mais simplificado, como o caso de existir ao lado dos sulfatos dos dois antibióticos um único derivado do ácido pantoténico.

Como fizemos para o estudo das outras especialidades em que se usou o processo cromatográfico, indicaremos, também para este caso, além dos resultados analíticos expressos em percentagem de actividade, o limite de confiança para um total de quatro dosagens distintas.

Protothenat (*) GRÜNENTHAL

COMPOSIÇÃO:

- Pantotenato de estreptomicina em quantidade equivalente a 0,1 *gramas* de estreptomicina-base.
- Pantotenato de di-hidro-estreptomicina em quantidade equivalente a 0,1 *gramas* de di-hidro-estreptomicina-base.
- Sulfato de estreptomicina em quantidade equivalente a 0,4 *gramas* de estreptomicina-base.
- Sulfato de di-hidro-estreptomicina em quantidade equivalente a 0,1 *gramas* de di-hidro-estreptomicina-base.

RESULTADO DA ANÁLISE:

- Actividade do pantotenato de estreptomicina em percentagem — 98,40.
Limite de confiança: 86,06 — 116,2.
- Actividade do pantotenato de di-hidro-estreptomicina em percentagem — 110,54.
Limite de confiança: 87,50 — 114,3.
- Actividade do sulfato de estreptomicina em percentagem — 100,54
Limite de confiança: 88,82 — 112,6.
- Actividade do sulfato de di-hidro-estreptomicina — 97,36.
Limite de confiança: 86,10 — 116,1.

(*) Especialidade farmacêutica adquirida na Suíça.

RESUMO E CONCLUSÕES

Descrevem-se, na primeira parte deste trabalho, métodos de dosagem dos sulfatos e pantotenatos de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina recorrendo à técnica polarográfica.

A dosagem da estreptomicina, fundamentando-se na redução em meio alcalino, do grupo aldeídico do antibiótico, foi executada empregando não só um tipo de polarógrafo corrente — o Sargent *modelo XXI* — como também um aparelho de maior sensibilidade — o polarógrafo de raios catódicos *modelo K1000* «Southern». Para um melhor conhecimento do grau de precisão e da reprodutibilidade da dosagem, realizámos, em ambos os casos, um estudo estatístico dos resultados para um total de 10 determinações distintas. Verificámos também a inteira concordância entre o método polarográfico e o microbiológico praticando dosagens pelos dois métodos em especialidades farmacêuticas contendo sulfato de estreptomicina e executando ainda ensaios de estabilidade sobre o referido antibiótico. Finalmente, queremos destacar as sensibilidades limites de dosagem do sulfato e do pantotenato de estreptomicina, empregando polarógrafo de raios catódicos, respectivamente, de 0,58 $\mu\text{g/ml}$ e de 0,99 $\mu\text{g/ml}$, valores estes obtidos com um erro de cerca de 5 %.

Para a di-hidro-estreptomicina indicamos dois métodos, um directo e um outro indirecto. O primeiro, é mais sensível (1,30 $\mu\text{g/ml}$ para o sulfato de di-hidro-estreptomicina e 2,19 $\mu\text{g/ml}$ para o pantotenato) e, baseia-se na propriedade deste antibiótico diminuir a altura do máximo polarográfico presente na onda do cobalto. Observámos, também, o paralelismo existente entre os resultados obtidos com este método e o microbiológico, indicando-se como limitação mais importante a impossibilidade da sua utilização em presença de estreptomicina.

O segundo método que propomos para a di-hidro-estreptomicina, utilizável mesmo em presença de estreptomicina, consiste numa dosagem polarográfica do formaldeído proveniente da oxidação periódica do antibiótico. Este novo processo quantitativo, empregando a técnica de oxidação periódica proposta por GAR-

LOCK e GROVE (75) para a dosagem da di-hidro-estreptomicina, oferece, sobre o método destes Autores, as vantagens de uma maior precisão e rapidez que lhe advêm da aplicação da técnica polarográfica à determinação do formaldeído.

A segunda parte da nossa contribuição pessoal visou o estabelecimento de um método de dosagem dos sais de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina que, a par de outras possibilidades de aplicação, fosse mais acessível a qualquer laboratório. Com efeito, tendo-se em conta a impossibilidade de aplicação dos métodos microbiológicos na análise quantitativa de misturas dos referidos antibióticos, propomos a sua separação prévia por cromatografia ou electroforese, seguindo-se a determinação quantitativa no cromatograma ou electroforegrama por técnica microbiológica apropriada.

Ensaio de prova levados a efeito com misturas conhecidas de sais de estreptomicina e di-hidro-estreptomicina, e com especialidades farmacêuticas contendo esses mesmos antibióticos, revelaram o interesse deste processo analítico.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) WAKSMAN, S. A., *Soil. Sci.*, **8**, 71 (1919).
- (²) WAKSMAN, S. A., *Soil. Sci.*, **43**, 51 (1937).
- (³) WAKSMAN, S. A. e FOSTER, J. W., *Soil. Sci.*, **43**, 69 (1937).
- (⁴) SCHATZ, A., BUGIE, E. e WAKSMAN, S. A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **55**, 66 (1944).
- (⁵) SCHATZ, A. e WAKSMAN, S. A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **57**, 244 (1944).
- (⁶) FELDMAN, W. H. e HINSHAW, E. C., *Proc. Staff. Meetings Mayo Clinic*, **19**, 593 (1944).
- (⁷) PECK, R. L., HOFFHINE, C. E. Jr. e FOLKERS, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 1390 (1946).
- (⁸) BARTZ, Q. R., CONTROULIS, J., CROOKS, H. M. Jr. e REBSTOCK, M. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2096 (1946).
- (⁹) FRIED, J. e WINTERSTEINER, O., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 79 (1947).
- (¹⁰) WAKSMAN, S. A. e SCHATZ, A., *Patente U. S. A.* — 2 449 866 (1945).
- (¹¹) CUNHA, A. P. M. A., *Bol. Esc. Farm. Univ. Coimbra*, ed. didáctica, **23**, 164 (1963).
- (¹²) WOODRUFF, H. B., *J. Bacteriol.*, **54**, 42 (1947).
- (¹³) DIETRICH, K. R., *Branntweinwirtschaft*, **74**, 349 (1952).
- (¹⁴) PERLMAN, D. e WAGMAN, G. H., *J. Bacteriol.*, **63**, 253 (1952).
- (¹⁵) HODINAR, F. e URLYCH, F., *Symposium on antibiotics, abstracts of communications*, Praga, pág. 103 (1959).
- (¹⁶) DUNALEY, E. L. e PERLMAN, D., *Bull. Torrey Bot. Club.*, **74**, 504 (1947).
- (¹⁷) BRINBERG, S. L. e GRABOVSKAJA, O. S., *Mikrobiologija*, **27**, 407 (1958). In «Die Antibiotica», pág. 28, vol. II, por R. BRUNNER e G. MACHEK. Editado por Hans Carl, Nürnberg (1962).
- (¹⁸) CARVAJAL, F., *Mycologia*, **45**, 209 (1953).
- (¹⁹) WOODRUFF, H., *Patente U. S. A.*, 2 585 713 (1952).
- (²⁰) DONOVICK, R. e RAKE, G., *J. Bacteriol.*, **53**, 205 (1946).
- (²¹) PECK, R. L., *Patente U.S. A.*, 2 498 574 (1950).
- (²²) DENKELWATER, R., COOK, M. A. e TISHLER, M., *Science*, **102**, 12 (1945).
- (²³) BRINK, N. G., KUEHL, F. A. Jr. e FOLKERS, K., *Science*, **102**, 506 (1945).

- (24) REGNA, P. P., WASSELLE, L. A. e SALOMONS, I. A., *J. Biol. Chem.*, **165**, 631 (1946).
- (25) FLOREY, H. W., CHAIN, E., HEATLEY, N. G., JENNINGS, M. A., SANDERS, A. G., ABRAHAM, E. P. e FLOREY, M. E., *Antibiotics*. Editado por Oxford University Press, Londres, pág. 1310 (1949).
- (26) OSWALD, E. J. e NIELSON, J. K., *Science*, **105**, 184 (1947).
- (27) WAKSMAN, S. A., BUGIE, E. e SCHATZ, A., *Proc. Staff. Meetings Mayo Clinic*, **19**, 537 (1944).
- (28) HEILMAN, D. H., *Proc. Staff. Meetings Mayo Clinic*, **20**, 146 (1945).
- (29) SCHENK, J. R. e SPIELMAN, M. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 2276 (1945).
- (30) DONOVICK, R., BAYAN, A. P., CANALES, P. e PANSY, F., *J. Bacteriol.*, **56**, 125 (1948).
- (31) GEIGER, W. B., GREEN, S. R. e WAKSMAN, S. A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **61**, 187 (1946).
- (32) DONOVICK, R. e RAKE, G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **61**, 224 (1946).
- (33) BERKMAN, S., HENRY, R. J. e HOUSEWRIGHT, R. D., *J. Bacteriol.*, **53**, 567 (1947).
- (34) VAN DOLAH, R. W. e CHRISTENSON, G. L., *Arch. Biochem.*, **12**, 7 (1947).
- (35) BONDI, A., DIETZ, C. C. e SPAULDING, E. H., *Science*, **103**, 399 (1946).
- (36) CAVALLITO, C. J., *J. Biol. Chem.*, **164**, 29 (1946).
- (37) PECK, R. L., BRINK, N. G., KUEHL, F. A., FLYNN, E. H., WALTJ, A. e FOLKERS, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1866 (1945).
- (38) KUEHL, F. A., PECK, R. L., HOFFHINE, C. E., GRABER, R. P. e FOLKERS, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 1460 (1946).
- (39) RYBAK, B. e GROSS, F., *Experientia*, **4**, 396 (1948).
- (40) LEMIEUX, R. U. e WOLFROM, M. L., «The chemistry of Streptomycin» pág. 337 — *Advances in Carbohydrate Chemistry*, vol. III. Editado por PIGMAN, W. W. e WOLFROM, M. L., Academic Press, N. Y. (1948).
- (41) BRINK, N. G. e FOLKERS, K., «Some aspects of streptomycin and other Streptomyces antibiotics», pág. 145, *Advances in Enzymology*, vol. X. Editado por Nord, F. F. Interscience Publishing Co. N. Y. (1950).
- (42) BRINK, N. G. e FOLKERS, K., «Streptomycin», pág. 55. Editado por Waksman, S. A., Williams & Wilkins Co. (1949).
- (43) WINTERSTEINER, O. e DUTCHER, J. D., *Ann. Rev. Biochem.*, **18**, 559 (1949).
- (44) BRINK, N. G., KUEHL, F. A. Jr. e FOLKERS, K., *Science*, **102**, 506 (1945).
- (45) BRINK, N. G., KUEHL, F. A. Jr., FLYNN, E. H. e FOLKERS, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2405 (1946).

- (46) KUEHL, F. A. JR., FLYNN, E. H., BRINK, N. G. e FOLKERS, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2679 (1946).
- (47) KUEHL, F. A. JR., PECK, R. L., HOFFHINE, C. E. JR., PEEL, E. W. e FOLKERS, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1234 (1947).
- (48) CARTER, H. E., LOO, Y. H. e SKELL, P. S., *J. Biol. Chem.*, **168**, 401 (1947).
- (49) HOOPER, I. F., KLEMM, L. H., POLGLASE, W. J. e WOLFROM, M. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 2120 (1946).
- (50) DONOVICK, R. e RAKE, G., *J. Bacteriol.*, **53**, 273 (1946).
- (51) LOO, Y. H., SKELL, P. S., THORNBERRY, H. H., EHRLICH, J., MC GUIRE, J. M., SAVAGE, G. M. e SYLVESTER, J. C., *J. Bacteriol.*, **50**, 701 (1945).
- (52) ABRAHAM, E. P. e DUTHIE, E. S., *Lancet*, **1**, 455 (1946).
- (53) MAY, J. R., VOUREKA, A. E. e FLEMING, A., *Brit. Med. J.*, **1**, 627 (1947).
- (54) BROWN, A. M. e YOUNG, P. A., *J. Gen. Microbiol.*, **1**, 353 (1947).
- (55) DONOVICK, R., HAMRE, D., KAVANAGH, F. e RAKE, G., *J. Bacteriol.*, **50**, 623 (1945).
- (56) KUTSCHER, A. H., SEGUIN, L., RANKOW, R. M. e PIRO, J. D., *Antibiot. Chemoterapy*, **8**, 576 (1958).
- (57) KELLY, J., SCHRET, W. C., KUTSCHER, A. H., e TUOTI, F., *Antibiot. Chemoterapy*, **9**, 87 (1959).
- (58) HANKA, L. J., BURCH, M. R. e SOKOLSKI, W. T., **9**, 432 (1959).
- (59) SGARZI, B., LUGLI, A. M. e GIOLITTI, G., *Antibiot. Chemoterapy*, **11**, 97 (1960).
- (60) SOKOLSKI, W. T., BURCH, M. R. e WHITFIELD, G. B., *Antibiot. Chemoterapy*, **11**, 103 (1960).
- (61) HANKA, L. J., MASON, D. J. e SOKOLSKI, W. T., *Antibiot. Chemoterapy*, **11**, 123 (1960).
- (62) KUTSCHER, A. H. e SEGUIN, L., *Antibiot. Chemoterapy*, **11**, 340 (1960).
- (63) SCHENCK, J. R. e SPIELMAN, M. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 2276 (1945).
- (64) BOXER, G. E., JELINEK, V. C. e LEGHORN, P. M., *J. Biol. Chem.*, **169**, 153 (1947).
- (65) FOLIN, O. e CIOCALTEAU, V., *J. Biol. Chem.*, **73**, 627 (1927).
- (66) GROVE, D. C., RANDALL, W. A., «Assay Methods of Antibiotics» pág. 39. Editado por Medical Encyclopedia, Inc. (1955).
- (67) BOROWIECKA, B., *Med. Dóswiadeczalna i Mikrobiol.*, **9**, 23 (1957). In *Chem. Abstr.*, **52**, 8277 (1957).
- (68) KARTREVA, V. D., CHEKULAEVA, S., KORCHAGIN, V. B. e BRUNS, B. P., *Antibiotiki*, **5**, 50 (1961). In *Chem. Abstr.*, **56**, 1202 (1961).
- (69) MARSHALL, E. K., BLANCHARD, K. C. e BUHLE, E. L., *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **90**, 367 (1947).
- (70) BOXER, G. E. e JELINEK, V. C., *J. Biol. Chem.*, **170**, 491 (1947).
- (71) FERRARI, A., *Anal. Chem.*, **31**, 1710 (1959).
- (72) DELABY, R. e STEPHAN, F., *Ann. Pharm. Franc.*, **7**, 513 (1950),

- (73) BOUGOULT, J. e GROSS, R., *J. Pharm. Chim.*, **26**, 5 (1922). In «Die Antibiotica», pág. 74, vol. II, por R. BRUNNER e G. MACHEK. Editado por Hans Carl, Nürnberg (1962).
- (74) FLEURY, P. e LANGE, J., *J. Pharm. Chim.*, **37**, 107 (1933). In «Die Antibiotica», pág. 75, vol. II, por R. BRUNNER e G. MACHEK. Editado por Hans Carl, Nürnberg (1962).
- (75) GARLOCK, A. E. e GROVE, D. C., *J. Clin. Invest.*, **28**, 843 (1949).
- (76) COLON, A. A., HERPICH, G. E., JOHL, R. G., NEUSS, J. D. e FREDIANI, H. A., *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, **39**, 335 (1950).
- (77) VAIL, W. A. e BRICKER, E. C., *Anal. Chem.*, **24**, 975 (1952).
- (78) HISCOX, D. J., *Anal. Chem.*, **23**, 923 (1951).
- (79) SULLIVAN, M. X. e HILMER, P., *Abstract of the 109th Meeting of the American Chemical Society*, Abril 1946, pág. 48.
- (80) MONASTERO, F., *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, **41**, 322 (1952).
- (81) SZAFIR, J. J. e BENNETT, E. O., *Science*, **117**, 717 (1953).
- (82) ALBANASE, A. A. e FRANKSTON, J. E., *J. Biol. Chem.*, **159**, 185 (1945).
- (83) VINCENT, D. e BRYGOO, P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **28**, 43 (1946).
- (84) SAKAGUCHI, S., *J. Biochem. Tokyo*, **5**, 25 (1925). In «Die Antibiotica», pág. 77, vol. II, por R. BRUNNER e G. MACHEK. Editado por Hans Carl, Nürnberg (1962).
- (85) SAKAGUCHI, S., *Japan. Med. J.*, **1**, 278 (1948). In «Die Antibiotica», pág. 77, vol. II, *ibid.*
- (86) SAKAGUCHI, S., *J. Biochem. Tokyo*, **38**, 91 (1951). In «Die Antibiotica», pág. 77, vol. II, *ibid.*
- (87) TIBALDI, E., *Farmaco (Pavia), Ed. Cient.*, **3**, 160 (1953).
- (88) TROUGHT, H., ASHTON, G. C. e BAKER, R. G., *Analyst*, **75**, 437 (1950).
- (89) SCUDI, J. V., BOXER, G. E., e JELINEK, V. C., *Science*, **104**, 486 (1946).
- (90) ELSON, L. A. e MORGAN, W. T., *J. Biochem.*, **27**, 1825 (1933).
- (91) KAMATA, H. e col., *J. Antibiotics Japan*, **6**, Ser. B 231 (1953). In «Die Antibiotica», pág. 79, vol. II, por R. BRUNNER e G. MACHEK. Editado por Hans Carl, Nürnberg (1962).
- (92) WEISS, P. J., *Antibiot. Chemoterapy*, **6**, 653 (1956).
- (93) MACHEK, G., *Scientia Pharm.*, **28**, 97 (1960).
- (94) VOGT, H., *Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges.*, **288/60**, 20 (1955).
- (95) FRIED, J., e WINTERSTEINER, O., *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 83 (1947).
- (96) NATARAJAN, R. e TAYAL, J. N., *J. Pharm. Pharmacol.*, **9**, 326 (1957).
- (97) VIALA, A., *Trav. soc. pharm. Montpellier*, **18**, 104 (1958).
- (98) LEVY, G. B., SCHWED, P. e SACKETT, J. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 528, (1946).
- (99) BRICKER, C. E. e VAIL, W. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 585 (1951).
- (100) HEUSER, L. J., DOLLIVER, M. A. e STILLER, E. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4013 (1953).
- (101) TSUKAMOTO, T. e TACHI, I., *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **26**, 133 (1952). «Polarography in Medicine, Biochemistry and Pharmacy», pág. 240,

- por M. BREZINA e P. ZUMAN. Editado por Interscience Publishers Inc., N. Y., (1958).
- (102) KUEHL, F. A., PECK, R. L., WALTI, A. e FOLKERS, K., *Science*, **102**, 34 (1945).
- (103) CONN, J. B. e NORMAN, S. L., *J. Clin. Invest.*, **28**, 837 (1950).
- (104) HORNE, R. E. e POLLARD, A. L., *J. Bacteriol.*, **55**, 321 (1948).
- (105) WINSTEN, A. W. e EIGEN, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3333 (1948).
- (106) PETERSON, D. H. e REINECKE, L. M., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 3598 (1950).
- (107) TITUS, E. e FRIED, J., *J. Biol. Chem.*, **168**, 393 (1947).
- (108) DRAKE, N. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 3803 (1950).
- (109) MUKHERJEE, S. K., SEN, G. P. e NANDI, P., *Indian J. Pharm.*, **15**, 273 (1953). In «Chromatographie en Chimie Organique et Biologique», pág. 803, vol. II, por E. LEDERER. Editado por Masson et Cie. (1960).
- (110) ISHIDA, N., MIRATORI, T., OKAMOTO, S. e MIYAZAKI, J., *J. Antibiotics*, **4**, 510 (1951). In «Chromatographie en Chimie Organique et Biologique», *ibid.*
- (111) FOSTER, M. C. e ASHTON, G. C., *Nature*, **172**, 958 (1953).
- (112) HOSOYA, S., SOEDA, M., KOMUTSU, N., HARA, N., SONODA, Y. e ARAI, R., *J. Antibiot. Japan*, **4**, 314 (1951). In «An Introduction to Paper Electrophoresis and Related Methods», pág. 136, por M. LEDERER. Editado por Elsevier Publishing Co. (1955).
- (113) KING, N. K. e DOERY, H. M., *Nature*, **171**, 878 (1953).
- (114) KUNKEL, H. e TISELIUS, A., *J. Gen. Physiol.*, **35**, 89 (1951).
- (115) PARTRIDGE, S. M., *Biochem. J.*, **42**, 238 (1948).
- (116) GULOTTA, G., *Riv. ist. sieroterap. ital.*, **29**, 44 (1957).
- (117) PHILIPPE, J., GOLDRINE, J. e ALCARAZ, O., *Ann. Pharm. Franc.*, **15**, 546 (1957).
- (118) CASTEL, M. M. P., MUS, R. e STORCK, J., *Ann. Pharm. Franc.*, **17**, 63 (1959).
- (119) BISERTE, G., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, 129 (1957).
- (120) ROUX, A., *Ann. Pharm. Franc.*, **6**, 388 (1948).
- (121) SOKOLSKI, W. T., KOFFLER, H. e TETRAULT, P. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 236 (1953).
- (122) PARTRIDGE, S. M. e BRIMLEY, R. C., *J. Biochem.*, **164**, 395 (1949).
- (123) PARTRIDGE, S. M., *Nature*, **164**, 443 (1949).
- (124) PARIS, R. e THEALLET, J. P., *Ann. Pharm. Franc.*, **20**, 436 (1962).
- (125) BRITTON, H. T. S. e ROBINSON, R. A., *J. Chem. Soc.*, **133**, 458 (1931).
- (126) HEYROVSKY, J. e ILKOVIC, D., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **7**, 198 (1935).
- (127) KOLTHÖFF, I. M. e LINGANE, J. J., *Chem. Rev.*, **24**, 1 (1939).
- (128) MÜLLER, O. H., *Chem. Rev.*, **24**, 95 (1939).
- (129) LINGANE, J. J. e DAVIS, O. L., *J. Biol. Chem.*, **137**, 567 (1941).

- (130) LINGANE, J. J. e LATTINEN, H. A., *Ind. Eng. Chem. — Anal. Ed.*, **15**, 504 (1939).
- (131) RANDLES, J. E. B. e AIREY, L., *Analyst.*, **72**, 301 (1947).
- (132) RANDLES, J. E. B., *Trans. Faraday Soc.*, **44**, 334 (1948).
- (133) DAVIS, H. M. e SEABORN, J. E., *Electronic Eng.*, **25**, 314 (1953).
- (134) LINGANE, J. J. e DAVIS, O. L., *J. Biol. Chem.*, **137**, 567 (1941).
- (135) BREZINA, M. e ZUMAN, P., «Polarography in Medicine Biochemistry and Pharmacy», pág. 707. Editado por Interscience Publishers, Inc., N. Y. (1958).
- (136) HAVINGA, E. e VELDSTRA, H., *Rec. trav. chim.*, **66**, 273 (1947).
- (137) VELDSTRA, H., HAVINGA, E., JULIUS, H. e WINKLER, K. C., «Modern Developments of Chemotherapy», pág. 74. Editado por Elsevier, Amsterdam (1946).
- (138) LUCENA, C. F. e GAGLIARDO, E., *Atti. accad. nazl. Lincei, Rend. Classe sci. fis., mat. e nat.*, **8**, 241 (1950). In *Chem. Abstr.*, **44**, 7626 (1950).
- (139) GHIGI, E. e CAPPELINA, F., *Boll. sci. fac. chim. ind., Bologna*, **6**, 34 (1948).
- (140) TALAFANT, E., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **15**, 232 (1950).
- (141) ZUMAN, P., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **20**, 883 (1955).
- (142) HEYROVSKY, J., SMOLER, I. e STASTNY, J., *Věstník. České akad. zemědělské*, **6**, 490 (1930). In «Polarography in Medicine, Biochemistry and Pharmacy», pág. 718, por M. BREZINA e P. ZUMAN. Editado por Interscience Publishers, Inc. N. Y. (1958).
- (143) HEYROVSKY, J. e SMOLER, I., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **4**, 521 (1932).
- (144) VAVRUCH, I., WAGNER, J. e HRUDKA, Z., *Listy cukrovar.*, **63**, 101 (1946-1947). In «Polarography in Medicine, Biochemistry and Pharmacy», pág. 719, *ibid.*
- (145) VAVRUCH, I., «Polarograficka maxima v teorii a praxi», SPICH, Prague (1949). In «Polarography in Medicine, Biochemistry and Pharmacy», pág. 720, *ibid.*
- (146) SCHWARZ, K., *Z. Anal. Chem.*, **115**, 161 (1939).
- (147) SCARAMELLI, G. e RICCIONI, M., *Boll. sci. fac. chim. ind. Bologna*, **94** (1940).
- (148) BRAGAGNOLO, G., *Ann. Chim. appl.*, **32**, 121 (1942).
- (149) BRUSTIER, V. e GARCIA-FERNANDES, H., *Ann. Pharm. Franc.*, **10**, 36 (1952).
- (150) VALDIGUE, P., e GARCIA-FERNANDES, H., *Ann. inst. hydrol. et. climatol.*, **22**, 43 (1951).
- (151) KURODA, K., *J. Chem. Soc. Japan*, **62**, 328 (1941). In «Polarography in Medicine, Biochemistry and Pharmacy», pág. 722, por M. BREZINA e P. ZUMAN. Editado por Interscience Publishing, Inc. N. Y. (1958).
- (152) KOLTHOFF, I. M. e MILLER, C. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 1013 (1941).

- (153) WARSHOWSKY, B. e ELVING, P. J., *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **18**, 253 (1946).
- (154) CANNON, W. A. e JACKSON, L. C., *Anal. Chem.*, **24**, 1053 (1952).
- (155) ELVING, P. J., WARSHOWSKY, B., SHOEMAKER, E. e MARGOLIT, J., *Anal. Chem.* **20**, 25 (1948).
- (156) FRANCIS, C. V., *Anal. Chem.*, **21**, 1238 (1949).
- (157) ZUMAN, P., «Prace Konf. Polarogr.», Warszawa, pág. 339 (1956).
In Anal. Chem., **30**, 663 (1958).
- (158) ZUMAN, P., SICHER, J., KRUPICKA, J., SVOBODA, M., *Nature*, **178**, 1407 (1956).
- (159) PECK, R. L., HOFFHINE, C. E. JR., PEEL, E. W., GRABER, R. P., HOLLY, F. W., MOZINGO, R. e FOLKERS, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 776 (1946).
KUEHL, F. A. JR., PECK, R. L., HOFFHINE, C. E. JR., PEEL, E. W. e FOLKERS, K., *ibid.*, **69**, 1234 (1947).
BRINK, N. G., KUEHL, F. A. JR., FLYNN, E. H. e FOLKERS, K., *ibid.*, **70**, 2085 (1948).
KUEHL, F. A. JR., PECK, R. L., HOFFHINE, C. E. JR. e FOLKERS, K., *ibid.*, **70**, 2325 (1948).
KUEHL, F. A. JR., BISHOP, M. N., FLYNN, E. H. e FOLKERS, K., **70**, 2613 (1948).
- (160) CARTER, H. E., CLARK, R. K. JR., DICKMAN, S. R., LOO, Y. H., MEEK, J. S., SKELL, P. S., STRONG, W. A., ALBERI, J. I., BARTZ, Q. R., BINKLEY, S. B., CROOKS, H. M. JR., HOOPER, I. R. e REBSTOCK, M. C., *Science*, **103**, 53 (1946).
- (161) FRIED, J., BOYACK, G. A. e WINTERSTEINER, O., *J. Biol. Chem.*, **162**, 391 (1946).
- (162) WOLFROM, M. L. e DE WALT, C. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3148 (1948).
- (163) LEMIEUX, R. U., DE WALT, C. W. e WOLFROM, M. L., *ibid.*, **69**, 1838 (1947).
- (164) FRIED, J. e STAVELY, H. E., *Abstract of paper presented before the Division of Biological Chemistry of the American Chemical Society at the Chicago meeting.* Abril (1948).
- (165) JACKSON, E. L., «Organic Reactions» Cap. 8, vol. II. Editado por John Wiley and Sons, Inc., N. Y. (1944).
- (166) BOOS, R. N., *Anal. Chem.*, **20**, 964 (1948).
- (167) WAWZONEK, S., *Anal. Chem.*, **21**, 61 (1949).
- (168) WHITNACK, G. C. e MOSHIER, R. W., *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **16**, 496 (1944).
- (169) BOYD, M. J. e LOGAN, M. A., *J. Biol. Chem.*, **146**, 279 (1942).
- (170) BOYD M. J. e BAMBACH, K., *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **15**, 314 (1943).
- (171) SHULMAN, M. S. e GAVRIKOVA, O. F., *Tr. Vses. Nauch. Int. S[ociet]*

- Promyshlennosti*, **5**, 176 (1955). In *Zhur. Khim.*, Abstr. nº 43.968 (1956). Apud *Anal. Abstr.*, nº 1252 (1957).
- (172) MAC NEVIN, W. M., URONE, P. F., OMIETANSKI, M. L. B., DUNTON, M. L., «5th Symposium on Combustion, Pittsburgh», Reimhold, N. Y., pág. 402 (1955).
- (173) SANDLER, S. e CHUNG, Y., *Anal. Chem.*, **30**, 1252 (1958).
- (174) PASCIAK, J., *Chem. Anal.*, Warsaw, **5**, 797 (1960). In *Chem. Abstr.*, **55**, 2347 (1960).
- (175) BRÓJO, A. P., «Contribuição para a análise quantitativa de aminoácidos. Tese de doutoramento, pág. 152, Coimbra (1960).
- (176) GOODALL, R. R. e LEVI, A. A., *Nature*. **158**, 675 (1946); *Analyst*, **72**, 277 (1947).
- (177) GLISTER, G. A. e GRAINGER, A., *Analyst*, **75**, 310 (1950).

ÍNDICE

	Págs.
Considerações gerais sobre a estreptomicina e di-hidro-estreptomicina	1
Propriedades químicas e constituição	5
Métodos de dosagem	8

CONTRIBUIÇÃO PESSOAL

I PARTE

Dosagem polarográfica da estreptomicina e da di-hidro-estreptomicina

I — Determinação quantitativa da estreptomicina	29
A — Comportamento polarográfico e mecanismo de redução do sulfato de estreptomicina.	30
B — Método de dosagem proposto para o sulfato de estreptomicina	44
C — Estudo comparativo dos métodos polarográfico e microbiológico na dosagem do sulfato de estreptomicina	53
D — Ensaio de estabilidade do sulfato de estreptomicina	61
E — Aplicação do método polarográfico à dosagem do pantotenato de estreptomicina.	67
II — Determinação quantitativa da di-hidro-estreptomicina	77
A — Determinação do sulfato de di-hidro-estreptomicina pelo método da diminuição do máximo da onda polarográfica do cobalto.	77
1) — Técnica proposta para a dosagem do sulfato de estreptomicina por método baseado na diminuição do máximo polarográfico presente na onda do cobalto	82

	Págs.
2) — Estudo comparativo dos métodos polarográfico e microbilógico na dosagem do sulfato de di-hidro-estreptomicina	83
3) — Ensaio de estabilidade do sulfato de di-hidro-estreptomicina.	90
4) — Influência dos sais de estreptomicina e de alguns produtos de degradação deste antibiótico sobre a dosagem polarográfica da di-hidro-estreptomicina	95
5) — Aplicação do método de redução do máximo polarográfico da onda do cobalto, à dosagem do pantotenato de di-hidro-estreptomicina	98
B — Determinação do sulfato de di-hidro-estreptomicina por método indirecto: oxidação periódica do antibiótico seguida de dosagem polarográfica do formaldeído libertado.	100

II PARTE

*Dosagem de misturas de sais de estreptomicina
e de di-hidro-estreptomicina usando a cromatografia e a electroforese
em papel como métodos separativos*

A — Determinação quantitativa de sais de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina recorrendo à cromatografia em papel.	118
B — Determinação quantitativa de sais de estreptomicina e de di-hidro-estreptomicina recorrendo à electroforese em papel	136
RESUMO E CONCLUSÕES	145
BIBLIOGRAFIA.	147



ERRATA

Pág.	Linha	Onde se lê	Deve ler-se
2	13	gelose	gelosa
6	7	glucose	glicose
8	12 e 19	gelose	gelosa
11	31	interferir	interferirem
16	5	estreptodina	estreptidina
19	19	à base de	contendo
21	17	1, × 27 × 5,5 cm	17 × 27 × 5,5 cm
31	Quadro V, primeira coluna	<i>pH</i> do tampão	<i>pH</i> do tampão
40	Legenda da Fig. 7	empregues de	preparados <i>seg.</i>
42	Legenda da Fig. 42	flexível	flexível
44	16	página 41	página 35
66	Quadro XIX, primeira coluna	10	10
80	2	γ	gama
81	16	pretende-mos	pretendemos
87	Quadro XXVII, título	di-hidro-estreptomi- cicina	di hidro-estreptomi- cina
112	Fig. 34	CONCENTRAÇÃO EM μg/ml	CONCENTRAÇÃO EM décimos de μg/ml
125	3	e da própria amostra	da própria amostra e
126	2	concentações	concentrações
133	4	suliato	sulfato