

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO  
AMBIENTAL

Tiago Augusto Donegatti

**UTILIZAÇÃO DA ELETROFORESE CAPILAR COMO TÉCNICA ANALÍTICA  
PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS EM SISTEMAS DE  
LIBERAÇÃO CONTROLADA E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Sorocaba

2020

Tiago Augusto Donegatti

**UTILIZAÇÃO DA ELETROFORESE CAPILAR COMO TÉCNICA ANALÍTICA  
PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS EM SISTEMAS DE  
LIBERAÇÃO CONTROLADA E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia e  
Monitoramento Ambiental para obtenção  
do título de Doutor em Biotecnologia e  
Monitoramento Ambiental

Orientação: Profa. Dra. Elisabete Alves  
Pereira

Financiamento: CAPES

Sorocaba

2020

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**TIAGO AUGUSTO DONEGATTI**

UTILIZAÇÃO DA ELETROFORESE CAPILAR COMO TÉCNICA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental. Sorocaba, 30 de abril de 2020.

Orientador

---

Dra. Elisabete Alves Pereira

Universidade Federal de São Carlos

Examinadores

---

Dr. Alexandre Donizeti Martins Cavagis

Universidade Federal de São Carlos

---

Dr. João Flávio Petrucci

Universidade Federal de Uberlândia

---

Dra. Luciana Camargo de Oliveira

Universidade Federal de São Carlos

---

Dra. Maria de Lourdes Leite de Moraes

Universidade Federal de São Paulo

## AGRADECIMENTO

Primeiramente, quero agradecer aos meus pais e minha família, por acreditarem no meu sonho e pelo apoio incondicional. Mãe, eu não poderia terminar sem dizer que eu te amo.

Ao Gledson, por ser a minha constante.

Aos meus amigos, em especial à Thais, Renata, Jéssica, Lanna e Rafa. Pessoal, muito obrigado por tornar momentos pesados em momentos de alegria e leveza. Obrigado por ouvir meus desabaços e pelas palavras de conforto. Vocês foram fundamentais para mim e não importa onde estejamos, eu vou guardar para sempre essas memórias.

Gostaria também de agradecer à minha orientadora Elisabete Alves, por partilhar seu conhecimento durante esses dez anos e por me guiar durante essa jornada.

Ao pessoal do laboratório da PUC-Sorocaba, em especial à Priscilla e à professora Eliana, obrigado pela ajuda técnica e por tornar meus dias, mesmo os mais difíceis, mais agradáveis

Ao João e ao professor Fábio Yamaji, pelo auxílio na utilização do MEV

À CAPES, pela bolsa de doutorado

.

## RESUMO

DONEGATTI, Tiago A. Título: Utilização da eletroforese capilar como técnica analítica para determinação de aminoglicosídeos em sistemas de liberação controlada e formulações farmacêuticas. 2020. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2020.

As Leishmanioses são doenças que vêm causando desafios para a saúde pública de países em desenvolvimento e, por esse motivo, diversos estudos vêm tentando desenvolver uma formulação mais eficaz para combatê-las. De acordo com a literatura, o uso de uma formulação contendo paromomicina (PM) produziu efeitos mais eficientes quando associada à gentamicina (GM) para o tratamento de certas espécies de leishmanioses. Para avaliar matrizes contendo PM e GM é necessária a utilização de um método de análise capaz de separar e quantificar esses analitos; no entanto, isso é um desafio, devido à natureza complexa da mistura desses antibióticos e pela ausência de grupos cromofóros em sua estrutura. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método para análise de PM e GM utilizando a CE acoplada com detector de arranjo de diodos, para isso, foi avaliado o uso de diferentes agentes derivatizantes (cloreto de dansil (DNS), cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl), 4-cloreto de metoxibenzenossulfonil (MBSC), ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (NQS), isotiocianato de fenilo (PITC) e ortoftaldeído (OPA)), além disso, foi desenvolvido e validado um método por detecção indireta, utilizando imidazol no eletrólito de corrida. NQS, FMOC-Cl e DNS mostraram-se insatisfatórios na separação dos fármacos nas condições testadas. Os melhores resultados obtidos para separação e quantificação de GM e PM foram alcançados usando OPA e nas seguintes condições: eletrólito de corrida contendo 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS, 3 mmol L<sup>-1</sup> de beta ciclodextrina (β-CD) e 15,5% de metanol (MeOH), pH 9,0, temperatura de 23 °C, tensão aplicada de 16 kV, injeção de 50 mbar x 5 s, capilar de 75 μm d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo) e detecção em 230 nm. Os testes de validação foram satisfatórios e os valores obtidos para a precisão e recuperação foram no intervalo de 0,1 – 15,5 % e 76,2 – 108,7 %, respectivamente. Neste trabalho foi desenvolvido um método simples e rápido capaz de separar e quantificar PM e GM, utilizando a detecção indireta, no qual as condições otimizadas foram: eletrólito de corrida contendo 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol, pH = 2,5. O comprimento total do capilar foi de 58,5 cm (50 cm de comprimento efetivo), com injeção de 30 mbar x 7 s. A tensão aplicada foi de 11 kV, temperatura de 29 °C e a detecção em: referência 400nm / sinal:

214 nm. Adicionalmente, esses métodos foram aplicados em amostras farmacêuticas e amostras de sistemas de liberação controlada contendo PM e GM. Essas aplicações foram comparadas com um método espectrofotométrico já descrito na literatura para análise de aminoglicosídeos.

Palavras-chave: Paromomicina. Gentamicina. Eletroforese capilar. Leishmanioses. Sistemas de liberação controlada.

## ABSTRACT

DONEGATTI, Tiago A. Title: Use of capillary electrophoresis as analytical technique for aminoglycosides determination in controlled release systems and pharmaceutical formulations. 2020. Thesis (Doctorate in Biotechnology and Environmental Monitoring) - Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba campus, Sorocaba, 2020.

Leishmaniasis are diseases that have been causing challenges for public health in developing countries and, for this reason, several studies have been trying to develop a more effective formulation to fight them. According to the literature, the use of a formulation containing paromomycin (PM) produces more efficient effects when associated with gentamicin (GM) for the treatment of certain species of leishmaniasis. To evaluate matrices containing PM and GM, it is necessary to use an analysis method capable of separating and quantifying these analytes, which is a challenge due to the complex nature of the mixture of these antibiotics as well as the absence of chromophoric groups in their structures. Thus, the objective of this work was to evaluate the use of different derivatizing agents (dansil chloride (DNS), 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl), methoxybenzenesulfonyl 4-chloride (MBSC), 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid (NQS), phenyl isothiocyanate (PITC) and orthophthalaldehyde (OPA) for separation of GM and PM by capillary electrophoresis coupled with diode array detector, beyond the development of a method for indirect detection using imidazole in the running electrolyte. NQS, FMOC-Cl and DNS were unsatisfactory for separating the drugs under the conditions tested. The best results obtained for separation and quantification of GM and PM were achieved using OPA and under the following conditions: running electrolyte containing 40 mmol L<sup>-1</sup> of TBS, 3 mmol L<sup>-1</sup> of beta cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and 15.5% of methanol (MeOH), pH 9.0, temperature of 23 ° C, applied voltage of 16 kV, injection of 50 mbar x 5 s, capillary of 75  $\mu$ m d.i x 40 cm of total length (31.5 cm in effective length) and detection at 230 nm. The validation tests were satisfactory and the values obtained of precision and recovery were in the range of 0.1 - 15.5% and 76.2 - 108.7%, respectively. A simple and fast method was also developed using indirect detection, in which the optimized conditions were: running electrolyte containing 30 mmol L<sup>-1</sup> of imidazole, pH = 2.5. The total capillary length was 58.5 cm (50 cm effective length), with an injection of 30 mbar x 7 s. The applied voltage was 11 kV in a temperature of 29 ° C and detection at: reference 400nm / signal: 214 nm. In addition, these methods were applied to

pharmaceutical samples and samples of controlled release systems containing PM and GM. These applications were compared with a spectrophotometric method already described in the literature for analysis of aminoglycosides.

Keywords: Paromomycin. Gentamicin. Capillary Electrophoresis. Leishmaniasis. controlled release systems.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema do ciclo das leishmanioses.....	22
<b>Figura 2.</b> Estrutura molecular da GM.....	27
<b>Figura 3.</b> Estrutura molecular da PM .....	28
<b>Figura 4.</b> Sistema de liberação – Reservatório.....	30
<b>Figura 5.</b> Sistema de liberação - Matricial.....	30
<b>Figura 6.</b> Sistema de liberação - Matricial com degradação.....	31
<b>Figura 7.</b> Sistema de liberação - Ligação Química.....	31
<b>Figura 8.</b> Sistema de liberação - Solvente.....	32
<b>Figura 9.</b> Degradação de PLGA – Hidrólise.....	34
<b>Figura 10.</b> Diferentes tipos de emulsão .....	35
<b>Figura 11.</b> Esquema de um sistema de CE .....	39
<b>Figura 12.</b> Fluxo eletrosmótico (EOF).....	40
<b>Figura 13.</b> Esquema de separação do modo FSCE .....	41
<b>Figura 14.</b> Esquema de separação dos analitos em MEKC .....	42
<b>Figura 15.</b> Esquema da janela de migração dos solutos em MEKC.....	43
<b>Figura 16.</b> Esquema do eletroferograma típico resultante da detecção indireta.....	44
<b>Figura 17.</b> Reação de derivatização entre DNS e aminas .....	70
<b>Figura 18.</b> Esquema da estrutura das ciclodextrinas .....	71
<b>Figura 19.</b> Avaliação do modo MEKC na separação de DNS-GM e DNS-PM.....	72
<b>Figura 20.</b> Avaliação do modo FSCE utilizando DNS.....	73
<b>Figura 21.</b> Reação de derivatização entre MBSC e amina.....	75
<b>Figura 22.</b> Branco da solução e padrões individuais de 200,0 mg L <sup>-1</sup> da GM e PM nas melhores condições de derivatização.....	77
<b>Figura 23.</b> Efeito da variação de pH na magnitude do sinal analítico (área) da GM.....	78
<b>Figura 24.</b> Efeito da concentração de SDS no sistema de separação.....	79
<b>Figura 25.</b> Efeito da ACN e MeOH no sistema de separação.....	80
<b>Figura 26.</b> Avaliação do modo FSCE utilizando MBSC .....	82
<b>Figura 27.</b> Reação de derivatização entre FMOC-Cl e amina .....	83
<b>Figura 28.</b> Separação em modo MEKC.....	84
<b>Figura 29.</b> Separação em modo FSCE.....	86
<b>Figura 30.</b> Reação de derivatização entre NQS e aminas.....	87
<b>Figura 31.</b> Separação em modo MEKC.....	88
<b>Figura 32.</b> Efeito de alguns modificadores no sistema de separação.....	90
<b>Figura 33.</b> Efeito do pH no sistema de separação.....	91
<b>Figura 34.</b> Reação de derivatização entre PITC e amina .....	94
<b>Figura 35.</b> Separação em modo MEKC.....	95
<b>Figura 36.</b> Efeito da composição do eletrólito no sistema de separação.....	97
<b>Figura 37.</b> Efeito do comprimento da coluna no sistema.....	99
<b>Figura 38.</b> Efeito da ureia no sistema de separação .....	100
<b>Figura 39.</b> Reação entre OPA e aminas na presença de ácido tioglicólico .....	103
<b>Figura 40.</b> Testes com diferentes modos de preparo e derivatização utilizando OPA (parte I).....	104
<b>Figura 41.</b> Testes com diferentes modos de preparo e derivatização utilizando OPA (parte II).....	106

<b>Figura 42.</b> Efeito da concentração de $\beta$ -CD .....	108
<b>Figura 43.</b> Efeito da concentração de TBS utilizando OPA .....	109
<b>Figura 44.</b> Efeito da temperatura do cartucho utilizando OPA.....	111
<b>Figura 45.</b> Efeito da concentração de MeOH no eletrólito utilizando OPA .....	112
<b>Figura 46.</b> Condições otimizadas utilizando OPA.....	114
<b>Figura 47.</b> Padrão individual de 250,0 mg L <sup>-1</sup> de GM .....	116
<b>Figura 48.</b> Padrão individual de 250,0 mg L <sup>-1</sup> de PM.....	117
<b>Figura 49.</b> Amostra comercial e amostra comercial fortificada com 60,0 mg L <sup>-1</sup> de GM e PM. ....	118
<b>Figura 50.</b> Comparação dos eletroferogramas de duas amostras diferentes .....	122
<b>Figura 51.</b> Perfil de liberação GM e PM em função do tempo. ....	124
<b>Figura 52.</b> Condições iniciais utilizando imidazol.....	126
<b>Figura 53.</b> Eletroferograma da condição selecionada para início da otimização de separação.....	127
<b>Figura 54.</b> Efeito da concentração de imidazol no eletrólito na eficiência dos picos .....	128
<b>Figura 55.</b> Estrutura do complexo de inclusão amina/éter-coroa.....	129
<b>Figura 56.</b> Efeito da presença e concentração de éter-coroa na eficiência dos componentes da GM, PM e AM .....	130
<b>Figura 57.</b> Efeito do pH no sistema de separação utilizando imidazol.....	131
<b>Figura 58.</b> Efeito de solventes orgânicos na eficiência e resolução dos componentes da GM, PM e AM.....	133
<b>Figura 59.</b> Efeito da temperatura na eficiência dos componentes da GM, PM e AM .....	134
<b>Figura 60.</b> Efeito da tensão na eficiência dos componentes de GM, PM e AM .....	135
<b>Figura 61.</b> Padrão de 200,0 mg L <sup>-1</sup> de GM, PM e AM e mistura.....	136
<b>Figura 62.</b> Amostra comercial e amostra comercial fortificada com 25,0 mg L <sup>-1</sup> de GM e PM (base). ....	138
<b>Figura 63.</b> Comparação dos eletroferogramas de duas amostras diferentes .....	142
<b>Figura 64.</b> Perfil de liberação GM e PM em função do tempo. ....	143
<b>Figura 65.</b> Imagens de MEV referentes à obtenção de MS pelo protocolo 01 .....	146
<b>Figura 66.</b> Imagens de MEV referentes à obtenção de MS pelo protocolo 02 .....	148
<b>Figura 67.</b> Imagem de MEV referente à obtenção de MS pelo protocolo 02 .....	149
<b>Figura 68.</b> Imagem de MEV referente à obtenção de MS pelo protocolo 03 .....	151
<b>Figura 69.</b> Imagem de MEV referente à obtenção de MS pelo protocolo 03 .....	152
<b>Figura 70.</b> Esquema da reticulação do alginato.....	152
<b>Figura 71.</b> Imagens de MEV referente à obtenção de MS pelo protocolo 03 .....	153
<b>Figura 72.</b> Eletroferograma da análise do sobrenadante pelo método de detecção indireta .....	155
<b>Figura 73.</b> Eletroferograma da análise do sobrenadante pelo método do OPA .....	156

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros obtidos da curva analítica dos AG utilizando o método do OPA .....	119
<b>Tabela 2.</b> Resultados de precisão utilizando o método do OPA. ....	120
<b>Tabela 3.</b> Resultados de recuperação utilizando o método do OPA. ....	121
<b>Tabela 4.</b> Concentração de GM base nas amostras comerciais (mg mL <sup>-1</sup> ) - média ± DP .....	122
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros obtidos da curva analítica dos AG utilizando o método de detecção indireta .....	139
<b>Tabela 6.</b> Resultados da precisão do método utilizando imidazol em detecção indireta .....	140
<b>Tabela 7.</b> Resultados da recuperação do método utilizando imidazol em detecção indireta .....	140
<b>Tabela 8.</b> Concentração de GM base nas amostras comerciais (mg mL <sup>-1</sup> ) - média ± DP .....	141

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Espécies de Leishmania x manifestação clínica.....	21
<b>Quadro 2.</b> Recomendações no tratamento das leishmanioses de acordo com a PAHO .....	24
<b>Quadro 3.</b> Limites de detecção para diferentes técnicas de detecção em CE.....	43
<b>Quadro 4.</b> Principais trabalhos publicados entre 1992 e 2019 sobre determinação de AG utilizando CE .....	49
<b>Quadro 5.</b> Reagentes utilizados .....	53
<b>Quadro 6.</b> Condições analíticas avaliadas para o DNS.....	72
<b>Quadro 7.</b> Condições analíticas avaliadas para o MBSC .....	76
<b>Quadro 8.</b> Condições analíticas avaliadas para o FMOC-Cl .....	83
<b>Quadro 9.</b> Condições analíticas avaliadas para o NQS.....	87
<b>Quadro 10.</b> Condições analíticas e instrumentais avaliadas para o método utilizando PITC .....	94
<b>Quadro 11.</b> Condições analíticas e instrumentais avaliadas para o método utilizando OPA.....	103
<b>Quadro 12.</b> Condições analíticas e instrumentais avaliadas para o método de detecção indireta .....	125
<b>Quadro 13.</b> Procedimentos avaliados para a síntese das microesferas. ....	144
<b>Quadro 14.</b> Comparação entre os procedimentos da literatura e as adaptações feitas nesse trabalho. ....	145

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
AG	Aminoglicosídeos
AM	Amicacina
CE	Eletroforese capilar, do inglês <i>capillary electrophoresis</i>
CE-ESI/MS	Eletroforese capilar acoplada com espectrometria de massas por ionização por electropulverização, do inglês, <i>capillary electrophoresis electrospray ionization- tandem mass spectrometry (CE-ESI-MS/MS)</i>
CFSE	Succinimidílico de 6-carboxifluoresceína, do inglês <i>6-carboxyfluorescein succinimidylester</i>
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio, do inglês <i>cetyltrimethylammonium bromide</i>
CV	Coeficiente de Variação
Cy5	Éster sulfoindociamino succinimidil, do inglês, <i>sulfoindocyanine succinimidyl ester</i>
DAD	Detector de arranjo de diodos, do inglês <i>diode-array detectors</i>
DChol	Desoxicolato de sódio monohidrato do inglês, <i>sodium deoxycholate monohydrate;</i>
DCM	Diclorometano, do inglês <i>dichloromethane</i>
DNS	Cloreto de dansila, do inglês <i>dansyl chloride</i>
DP	Desvio Padrão
EOF	Fluxo eletrosmótico, do inglês <i>electroosmoticflow</i>
EtOH	Etanol
FC	Surfactante fluoroquímico, do inglês <i>fluorochemical surfactant</i>
FDA	Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos, do inglês <i>food and drug administration</i>
FMOC-Cl	Cloroformiato de 9-fluorenilmetila, do inglês <i>9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride</i>
FSCE	Eletroforese capilar em Solução Livre, do inglês <i>free-solution capillary electrophoresis</i>
GM	Gentamicina
HAc	Ácido acético
HPLC	Cromatografia de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>

ICH	Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano, do inglês <i>international conference on harmonisation</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LOD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>
LV	Leishmaniose visceral
m/v	Massa por volume
v/v	Volume por volume
MBSC	4-Cloreto de Metoxibenzenossulfonil, do inglês 4- <i>methoxybenzenesulfonyl chloride</i>
MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar, do inglês <i>micellar electrokinetic chromatography</i>
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de massas, do inglês <i>mass spectrometry</i>
NQS	ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico, do inglês 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid
NM	Neomicina
OPA	Ortoftaldeído, do inglês <i>o-phthalaldehyde</i>
PGD	Detector de gradiente de potencial, do inglês, <i>potential gradient detector</i>
PAHO	Organização Pan-Americana de Saúde, do inglês <i>pan american health organization</i>
Ph.Eur.	Farmacopeia Europeia, do latim <i>pharmacopoeia europaea</i>
PHA	Poli - hidroxialcanoato
PITC	Isotiocianato de fenilo, do inglês <i>phenyl isothiocyanate</i> )
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PM	Paromomicina
PVA	Poli (álcool vinil), do inglês <i>poly(vinylalcohol)</i>
S/N	Sinal-ruído, do inglês <i>signal to noise</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulfates</i>
SLC	Sistema de Liberação Controlada
TEA	Trietilamina
TM	Tobramicina

TTAB	Brometo de tetradeciltrimetilamônio, do inglês <i>tetradecyltrimethylammonium bromide</i>
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos, do inglês <i>United States pharmacopeia</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês, <i>world health organization</i>
W/O	Água/Óleo, do inglês <i>water/oil</i>
W/O/W	Água/óleo/água, do inglês <i>water/oil/water</i>
β-CD	β- ciclodextrina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
1.1. LEISHMANIOSE .....	20
1.1.1. Aspectos Gerais .....	20
1.1.2. Agente Etiológico e Vetores .....	21
1.1.3. Ciclo Biológico.....	21
1.1.4. Padrão de Transmissão .....	22
1.1.5. Ocorrência.....	23
1.1.6. Tratamento .....	23
1.1.6.1. Antimoniais Pentavalentes.....	24
1.1.6.2. Isetionato de pentamidina .....	25
1.1.6.3. Miltefosina .....	25
1.1.6.4. Anfotericina B.....	25
1.1.6.5. Tratamentos não convencionais .....	26
1.2. AMINOGLICOSÍDEOS.....	26
1.2.1. Gentamicina .....	26
1.2.2. Paromomicina .....	27
1.3. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	29
1.3.1. Matrizes em SLC .....	32
1.3.1.1. Polímeros e PLGA (poli (ácido láctico-co-glicólico)).....	33
1.3.1.1.1. Microencapsulação e microesferas.....	35
1.4. DESAFIOS NA DETERMINAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS EM SLC.....	37
1.5. ELETROFORESE CAPILAR.....	38
1.5.1. Modos de Operação .....	40
1.5.1.1. Eletroforese capilar em Solução Livre.....	41
1.5.1.2. Cromatografia Eletrocínética Micelar .....	42
1.5.2. Detecção.....	43
1.6. MÉTODOS PARA ANÁLISE DE AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO A ELETROFORESE CAPILAR .....	45
<b>2. OBJETIVO</b> .....	52
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	53
3.1. MATERIAL .....	53
3.2. INSTRUMENTAÇÃO .....	55
3.3. MÉTODOS.....	55



<b>3.3.1. Desenvolvimento do Método para Separação e Quantificação de GM e PM Utilizando a CE-DAD</b> .....	55
3.3.1.1. Cloreto de Dansila (DNS).....	55
3.3.1.1.1. <i>Preparo das Soluções e Amostras</i> .....	55
3.3.1.1.2. <i>Derivatização da PM e GM</i> .....	56
3.3.1.1.3. <i>Condições Analíticas e Instrumentais</i> .....	56
3.3.1.2. 4-metoxibenzenossulfonil (MBSC) .....	56
3.3.1.2.1. <i>Preparo das Soluções e Amostras</i> .....	56
3.3.1.2.2. <i>Derivatização com GM e PM</i> .....	57
3.3.1.2.3. <i>Condições Analíticas e Instrumentais</i> .....	57
3.3.1.3. Cloreto de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) .....	57
3.3.1.3.1. <i>Preparo dos Padrões de GM e PM e do Derivatizante</i> .....	57
3.3.1.3.2. <i>Derivatização com GM e PM</i> .....	58
3.3.1.3.3. <i>Condições Analíticas e Instrumentais</i> .....	58
3.3.1.4. Ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (NQS).....	58
3.3.1.4.1. <i>Preparo das Soluções e Amostras</i> .....	58
3.3.1.4.2. <i>Derivatização com GM e PM</i> .....	59
3.3.1.4.3. <i>Condições Analíticas e Instrumentais</i> .....	59
3.3.1.5. Isotiocianato de Fenilo (PITC).....	59
3.3.1.5.1. <i>Preparo das Soluções e Amostras</i> .....	59
3.3.1.5.2. <i>Derivatização com GM e PM</i> .....	59
3.3.1.5.3. <i>Condições Analíticas e Instrumentais</i> .....	60
3.3.1.6. Ortoftaldeído (OPA) .....	60
3.3.1.6.1. <i>Preparo das Soluções e Amostras</i> .....	60
3.3.1.6.2. <i>Derivatização com GM e PM</i> .....	61
3.3.1.6.3. <i>Condições Analíticas e Instrumentais</i> .....	61
3.3.1.7. Detecção Indireta .....	62
3.3.1.7.1. <i>Preparo dos Padrões e Aplicação do Método</i> .....	62
3.3.1.7.2. <i>Condições analíticas e instrumentais</i> .....	64
3.3.1.8. Método Espectrofotométrico Utilizando Ninidrina.....	64
3.3.1.8.1. <i>Preparo das Soluções e Amostras</i> .....	64
3.3.1.8.2. <i>Derivatização com GM e PM</i> .....	65
<b>3.3.2. Obtenção e Caracterização das Microesferas de PLGA</b> .....	65
3.3.2.1. Obtenção das Microesferas .....	65
3.3.2.2. Microscopia.....	66
3.3.2.3. Eficiência.....	66

3.3.2.4.	Perfil de Liberação .....	66
3.3.2.5.	Análise da curva de liberação para as microesferas.....	67
<b>3.3.3.</b>	<b>Validação do Método para Separação e Quantificação de GM e PM Utilizando CE-DAD .....</b>	<b>67</b>
3.3.3.1.	Seletividade.....	67
3.3.3.2.	Linearidade e intervalo de análise.....	68
3.3.3.3.	Precisão .....	68
3.3.3.4.	Exatidão .....	68
3.3.3.5.	Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ).....	69
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
4.1.	DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS .....	70
4.1.1.	<b>Cloreto de Dansila (DNS) .....</b>	<b>70</b>
4.1.2.	<b>4-cloreto de metoxibenzenosulfonila (MBSC).....</b>	<b>75</b>
4.1.3.	<b>Cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl).....</b>	<b>83</b>
4.1.4.	<b>Ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (NQS).....</b>	<b>87</b>
4.1.5.	<b>Isotiocianato de Fenila (PITC).....</b>	<b>94</b>
4.1.6.	<b>Ortoftaldeído (OPA).....</b>	<b>103</b>
4.1.6.1.	Validação do método .....	117
4.1.6.1.1.	<i>Seletividade, LOD, LOQ e linearidade .....</i>	<i>117</i>
4.1.6.1.2.	<i>Precisão.....</i>	<i>119</i>
4.1.6.1.3.	<i>Recuperação .....</i>	<i>120</i>
4.1.6.1.4.	<i>Aplicação .....</i>	<i>121</i>
4.1.7.	<b>Desenvolvimento do método com detecção indireta .....</b>	<b>125</b>
4.1.7.1.	Condições Iniciais .....	126
4.1.7.2.	Efeito da Concentração de Imidazol no Eletrólito.....	127
4.1.7.3.	Efeito da Adição de Aditivos no Eletrólito.....	128
4.1.7.4.	Efeito do pH no eletrólito .....	130
4.1.7.5.	Efeito de Solventes Orgânicos no Eletrólito .....	132
4.1.7.6.	Efeito da Temperatura no Sistema de Separação .....	133
4.1.7.7.	Efeito da Tensão .....	134
4.1.7.8.	Efeito do Tempo de Injeção .....	135
4.1.7.9.	Condições Otimizadas para o Método de Detecção Indireta .....	136
4.1.7.10.	Validação do Método.....	137
4.1.7.10.1.	<i>Seletividade, LOD, LOQ e Linearidade.....</i>	<i>138</i>
4.1.7.10.2.	<i>Precisão.....</i>	<i>139</i>
4.1.7.10.3.	<i>Recuperação.....</i>	<i>140</i>

4.1.7.10.4. <i>Aplicação do método</i> .....	141
4.2. SÍNTESE DAS MICROESFERAS.....	144
4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS .....	154
<b>4.3.1. Eficiência de encapsulação</b> .....	154
<b>4.3.2. Perfil de Liberação</b> .....	156
<b>5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	158

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. LEISHMANIOSE

#### 1.1.1. Aspectos Gerais

Leishmanioses são doenças zoonóticas que ocasionam diversas manifestações clínicas em humanos, cães e outros mamíferos. Representam um grande problema de saúde pública em países em desenvolvimento, atingindo mais de um milhão de pessoas no mundo todo, sendo o Brasil o país com a maior quantidade de casos graves registrados do continente americano (LUZ et al., 2020; PIGOTT et al., 2014).

Sua transmissão ocorre por meio da picada de diferentes espécies de flebotomíneos infectados, que transmitem o protozoário do gênero *Leishmania* para o corpo do hospedeiro, sendo nas Américas o principal vetor de transmissão os insetos do gênero *Lutzomyia* (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). O tratamento recomendado geralmente envolve o uso de drogas antimoniais pentavalentes e, nos casos mais graves, a administração de anfotericina B. Todos os fármacos disponíveis atualmente podem causar diversos efeitos colaterais devido à alta toxicidade (OLIVEIRA et al., 2011; CUNHA et al., 2015; SHIRZADI, 2019).

As leishmanioses são caracterizadas de acordo com a manifestação clínica, sendo divididas em dois tipos principais: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT), que é o tipo mais comum no Brasil e que também costuma ser subdividido em Leishmaniose cutânea localizada (LC), Leishmaniose Mucosa (LM), Leishmaniose cutânea difusa (LCD), Leishmaniose cutânea atípica (LCA) e Leishmaniose cutânea disseminada (LCDi). Os fatores envolvidos na expressão de sinais clínicos estão relacionados à resposta imune do indivíduo infectado e à espécie do agente etiológico (CONCEIÇÃO-SILVA & ALVES, 2014, p. 18-20; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2019). O diagnóstico das Leishmanioses envolve aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Em muitos casos, a junção desses fatores é necessária para o diagnóstico final (ANDRADE et al., 2008).

Nas Américas, as leishmanioses são principalmente encontradas no Brasil e em países vizinhos, como Colômbia (HERRERA et al., 2019), Bolívia (EID et al., 2018) e Peru (ROJAS-JAIMES et al., 2019). A LC pode se manifestar de diversas formas, que vão desde pequenos eritemas, destruição do tecido da pele, surgimento de

úlceras (SOLOMON; SCHWARTZ, 2018) até lesões nas regiões do nariz e da boca (SANTOS et al., 2013). A Leishmaniose Visceral é a forma mais nociva da doença, pois causa dano aos órgãos internos e leva ao óbito com maior frequência (BRASIL, 2019a).

### 1.1.2. Agente Etiológico e Vetores

Leishmanias são protozoários da Família *Trypanomisomatidae* e são divididas em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* (subgênero endêmico das Américas) (DIOTALLEVI et al., 2020). No Brasil, sua transmissão acontece por meio de insetos flebótomos do gênero *Lutzomyia* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Nas Américas, são encontrados mais de 15 tipos de espécies de leishmanias, sendo os casos de LV associados à espécie *L. Infantum*. As LC podem ser causadas tanto pelo subgênero *Leishmania* quanto pelo subgênero *Viannia*, embora a LM esteja associada apenas ao subgênero *Viannia* (Quadro 1) (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2019).

**Quadro 1.** Espécies de *Leishmania* x manifestação clínica

Subgênero			
Leishmania		Viannia	
Leishmaniose Visceral	Leishmaniose Cutânea	Leishmaniose Cutânea	Leishmaniose Mucosa
<i>L. Infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lisoni</i> <i>L. linderbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i>

Fonte: Adaptado de ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, (2019).

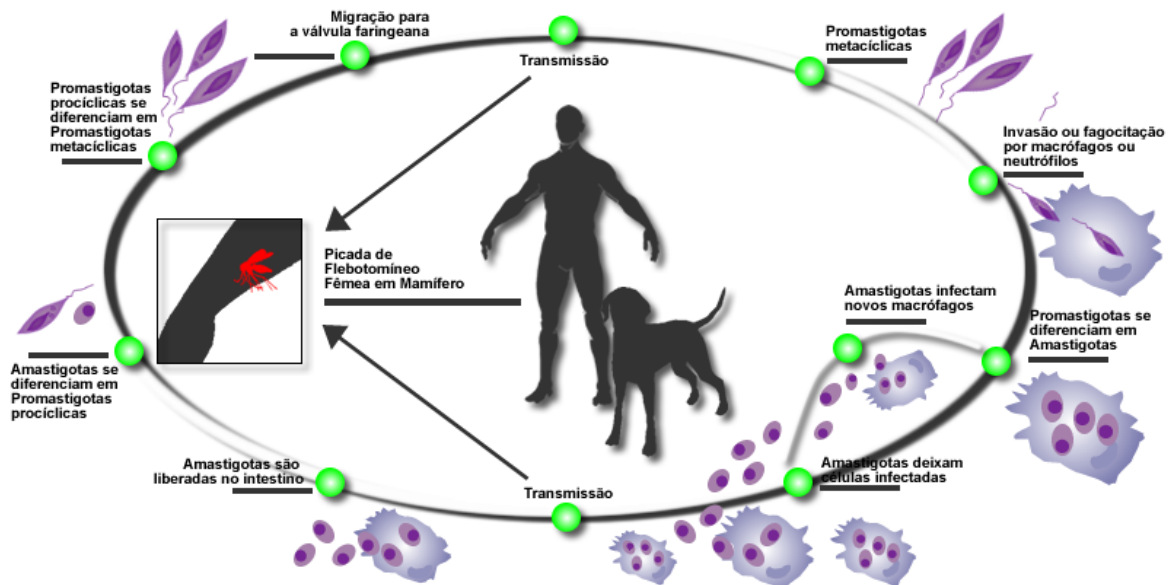
### 1.1.3. Ciclo Biológico

O ciclo biológico dá início quando as fêmeas dos mosquitos, popularmente conhecidos como “mosquitos palha”, durante o repasto sanguíneo, picam um animal infectado e ingerem os protozoários (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012). Uma

vez instalados em seu sistema digestivo, assumem a forma promastigota (do grego “*pro*”, anterior e do grego “*mastyx*”, chicote/flagelo) e podem então ser transmitidos para animais que servirão de reservatórios ou diretamente para cães e humanos, que agem como hospedeiros do parasito (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Nos hospedeiros, se alojam no vacúolo parasitóforo das células do sistema fagocítico (localizados próximos à epiderme e à derme) e assumem a forma amastigota (do latim

**Figura 1.** Esquema do ciclo das leishmanioses

“*a*”, sem/ausente e do grego “*mastyx*”, chicote/flagelo), multiplicando-se e infectando



novos macrófagos (Figura 1) (BATES, 2007; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014).

Fonte: adaptado de VILLAREAL, (2008)

#### 1.1.4. Padrão de Transmissão

Segundo o Ministério da Saúde, há três padrões epidemiológicos das leishmanioses no Brasil. O padrão silvestre é o primeiro deles, no qual a transmissão ocorre em ecossistemas florestais e está associada ao contato de seres humanos com animais silvestres. O segundo padrão, ocupacional e lazer, está associado à exploração de recursos naturais, atividades agropecuárias e ecoturismo. O terceiro padrão, rural e periurbano, está relacionado à desigualdade social, processos migratórios, em que ocorre ocupação de encostas, e aos aglomerados urbanos próximos a matas residuais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017)..

Outros fatores, como desmatamento, mudanças climáticas, construção de estradas/hidrelétricas, criação de novas áreas agrícolas e umidade do ambiente também contribuem para a incidência da doença.(OLIVEIRA et al., 2016; FIORAVANTI, 2018).

#### **1.1.5. Ocorrência**

As leishmanioses ocorrem em diversos países do mundo. Existem casos registrados em 98 países, mas o Brasil é um dos mais afetados pela doença, principalmente na região norte, onde está localizada a Amazônia (ALVAR et al., 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019). Em 2018, do total de casos de LC e LM nas Américas, 35,7% foram no Brasil e, em relação à LV, esse número é ainda maior, chegando a 97,3% (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019). Embora casos de infecção por LC sejam mais comuns na região norte, desde 1990 a região com mais casos de LV é a região nordeste, com 50% dos quase 3,5 mil casos registrados no ano de 2018, de acordo com dados divulgados pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2019b).

#### **1.1.6. Tratamento**

A escolha mais adequada para o tratamento das leishmanioses deve levar em conta diferentes aspectos, tais como: manifestações clínicas, espécie do agente etiológico, número e localização das lesões, estado geral da saúde do paciente, patologias concomitantes, localização geográfica, bem como a disponibilidade dos medicamentos (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2019). De acordo com o *Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas*, publicado pela Organização Pan-americana de Saúde, os fármacos mais utilizados para o tratamento das leishmanioses são: antimoniais pentavalentes, isetionato de pentamidina e anfotericina B (nas formas de desoxicolato e liposomal) (Quadro 2).

**Quadro 2.** Recomendações no tratamento das leishmanioses de acordo com a PAHO

Manifestação clínica	Tipo de tratamento		Recomendação PAHO
LC	Local	Termoterapia	Quando os tratamentos sistêmicos não são indicados ou quando tratamentos locais são necessários.
		Antimoniais intralesionais (Local)	
	Sistêmico	Antimoniais pentavalentes (IV ou IM)	De primeira escolha.
		Miltefosina Isetionato de pentamidina Cetoconazol Anfotericina B	Para LC causada por <i>L. guyanensis</i> ou <i>L. panamensis</i> . São indicados para casos de falha terapêutica da opção de medicamentos já utilizados ou em situações especiais.
LM	Sistêmico	Antimoniais pentavalentes (IV ou IM)	Primeira escolha.
		Antimoniais pentavalentes (IV ou IM) + pentoxifilina (oral)	São indicados para casos de falha terapêutica da opção de medicamentos já utilizados ou em situações especiais.
		Anfotericina B	
		Miltefosina	
LV	Sistêmico	Anfotericina B (IV)	Recomenda-se o uso de anfotericina B lipossômica, antimoniais pentavalentes ou desoxicolato de anfotericina B no tratamento da leishmaniose visceral (qualidade muito baixa e forte recomendação).
		Antimoniais pentavaletes (IV ou IM)	

Legenda: (IV) intravenosa, (IM) intramuscular, (LV) Leishmaniose Visceral, (LC) Leishmaniose cutânea (LM) Leishmaniose mucosa Adaptado de: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, (2019).

#### 1.1.6.1. Antimoniais Pentavalentes

Os antimonais pentavalentes estão disponíveis em duas formas: o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina, sendo apenas este último utilizado no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Esses fármacos são utilizados como tratamento de primeira escolha para a maioria dos casos de leishmanioses durante muitas décadas. Apesar de muitos anos de uso, o mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido, mas sabe-se que está relacionado à redução da síntese de adenosina-trifosfato (ATP) nos protozoários (AN et al., 2019). Há duas principais desvantagens no uso desses medicamentos. A primeira é que casos de resistência e reincidência ao antimonais pentavalentes têm sido cada vez mais crescentes, principalmente no velho mundo (SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019). A segunda desvantagem é referente à sua toxicidade e desconforto no uso, razão pela



qual são contraindicados em casos de gravidez, hipersensibilidade aos componentes da droga, disfunção renal, cardíaca e hepática (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

#### 1.1.6.2. Isetionato de pentamidina

A pentamidina é uma diamidina aromática. No organismo, esse composto interfere na síntese de poliaminas, inibindo a síntese de enzimas importantes para o metabolismo celular do parasita (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). No Brasil, pode ser utilizado no tratamento de LC, com precaução, em pacientes cardiopatas, nefropatas, hepatopatas, entre outras patologias. Apesar da recomendação da PAHO, tanto para o uso intravenoso (IV) ou intramuscular (IM) da pentamidina, evidências sugerem um maior risco na falha do tratamento se aplicado este medicamento por via IM (CHRISTEN et al., 2018).

#### 1.1.6.3. Miltefosina

Miltefosina é um alquilfosfolipídio que pode ser administrado por via oral. Por ser um composto quimicamente parecido com os fosfolipídios das membranas celulares, essa molécula interfere na membrana celular do parasito, alterando sua composição, permeabilidade, fluidez e induzindo a apoptose (DA COSTA FILHO; LUCAS; SAMPAIO, 2008; SRIVASTAVA et al., 2017). Uma desvantagem desse medicamento é que já existem casos registrados de resistência de LV na Índia, relacionados a esse fármaco (SRIVASTAVA et al., 2017).

#### 1.1.6.4. Anfotericina B

A anfotericina B é um composto com atividade antibiótica para fungos e protozoários. Seu mecanismo de ação baseia-se na ligação ao ergosterol, alterando a permeabilidade e o equilíbrio osmótico do parasita (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Entretanto, por se ligar também ao colesterol, esse composto é bastante tóxico para os seres humanos e seu uso está associado com diversos efeitos adversos, como nefrotoxicidade e toxicidade hematológica (FALCI; PASQUALOTTO, 2015). Comercialmente, esse composto está disponível em duas formulações, com desoxicolato de sódio ou em formulações lipossomais. O desoxicolato é utilizado para solubilizar o composto em água e estabilizar a suspensão (MARTINEZ, 2006). Outras formulações utilizam a incorporação da anfotericina B em lipossomas, que são tão

eficazes no tratamento quanto a anfotecina B-desoxicolato, porém menos tóxicas (BRANCO FILIPPIN; CANES SOUZA, 2006).

#### 1.1.6.5. Tratamentos não convencionais

Nas últimas décadas, a paromomicina (PM), um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, tem sido utilizada para o tratamento da leishmaniose e o objetivo de diversos estudos vem sendo desenvolver uma formulação mais eficaz no combate à doença. De acordo com a literatura, o uso de uma formulação de PM (15%) produziu efeitos mais eficientes, principalmente quando associada a 0,5% de gentamicina (GM) (outro aminoglicosídeo) e surfactantes para o tratamento de *L. major* (SALAH et al., 2009; BARRETT; CROFT, 2012).

### 1.2. AMINOGLICOSÍDEOS

Aminoglicosídeos (AG) são antimicrobianos caracterizados por dois ou mais aminoaçúcares, unidos por ligação glicosídica a um anel aminociclitol (FAROUK; AZZAZY; NIESSEN, 2015). A descoberta dessa classe de antibióticos foi feita em 1943, por Waksman e colaboradores. Esses pesquisadores isolaram uma cepa de *Streptomyces griseus*, que produzia a estreptomina (JIANG; KARASAWA; STEYGER, 2017). A partir desses estudos, novos compostos foram isolados e, atualmente, são conhecidos mais de 14 tipos naturais e sintéticos de aminoglicosídeos (FORGE; SCHACHT, 2000). Essa classe de antibióticos possui um amplo espectro de ação e é usada contra bactérias gram-positivas e negativas, sendo possível ainda o seu uso no tratamento de algumas protozooses (FORGE; SCHACHT, 2000; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006; FAROUK; AZZAZY; NIESSEN, 2015).

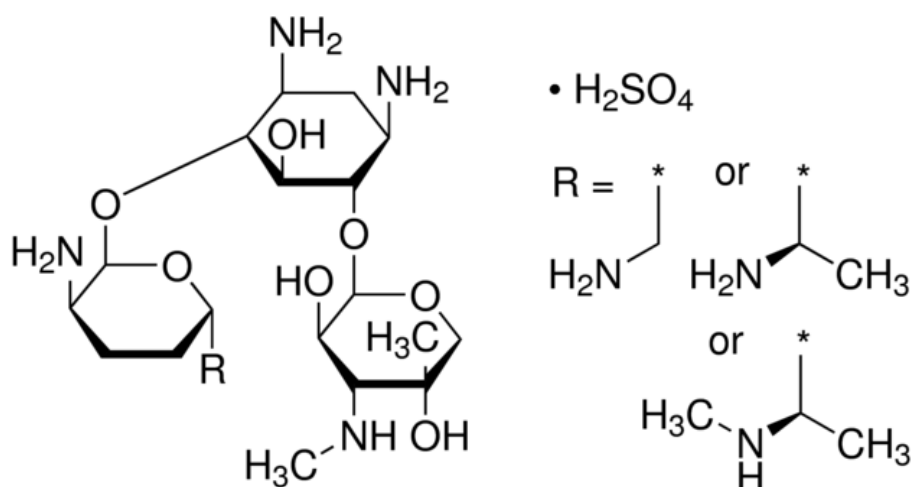
#### 1.2.1. Gentamicina

Quimicamente, a GM é uma mistura complexa de cinco componentes majoritários (C1, C1a, C2 e C2a e C2b) e várias impurezas (sisomicina, garamina, gentamicina B<sub>1</sub> entre outros) (COUNCIL OF EUROPE, 2004). Seus valores de pKa são 10,18 e 12,55 (DRUGBANK, 2005).

A GM (Figura 2) é um antibiótico efetivo no tratamento de infecções causadas por bactérias aeróbias gram negativas. É bastante utilizada, devido à sua baixa taxa de resistência antimicrobiana e ao seu baixo custo (ALMEIDA, E.V.S.; WAGNER, 2014). Esse fármaco é usado no tratamento de diversas infecções em hospitais e

tratamentos oftalmológicos (SRISUNG et al., 2017). Foi isolado em 1963, de *Micromonospora purpúrea* e o uso desse composto, em determinadas doses, pode causar nefrotoxicidade e ototoxicidade (SANTUCCI; KRIEGER, 2000; OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006). Por essas razões, diferentes estudos vêm sendo avaliados para desenvolver métodos que sejam capazes de diminuir a biodisponibilidade sistêmica do fármaco e aumentar seus efeitos terapêuticos (ISMAIL et al., 2016).

**Figura 2.** Estrutura molecular da GM

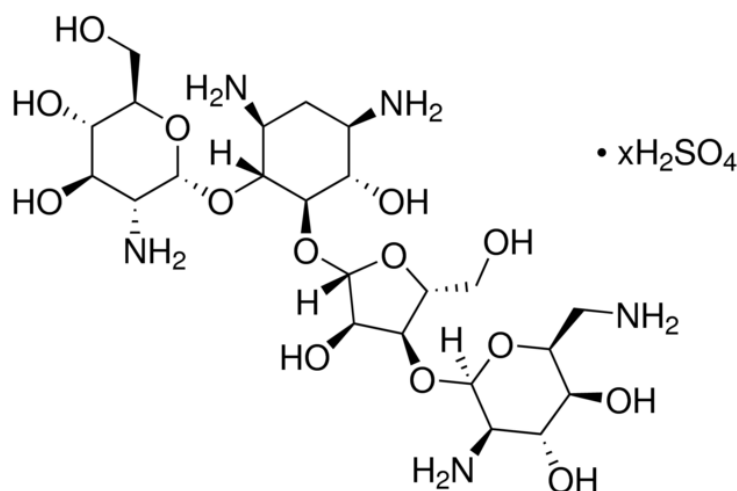


Fonte: SIGMA-ALDRICH, (2018)

### 1.2.2. Paromomicina

A Paromomicina (PM) (Figura 3) foi isolada pela primeira vez de *Streptomyces krestomuceticus* em 1950. Possui valores de pKa iguais a 9,94 e 12,23 (DRUGBANK, 2007). É usada como antibiótico no tratamento de diversas infecções causadas por vermes e protozoários, como amebíase, giardíase, leishmaniose, entre outros (KREUTNER; DEL BENE; AMSTEY, 1981; EL-ON et al., 1986; PETRI, 2003). Pode ser administrada por via oral, uso tópico ou injeção intramuscular.

**Figura 3.** Estrutura molecular da PM



Fonte: SIGMA-ALDRICH, (2018)

A PM altera a leitura do RNA mensageiro ao se ligar ao fragmento 30S dos ribossomos, o que inibe a síntese proteica dos organismos (CARTER et al., 2000). Possui um amplo espectro de atividade contra um grande número de bactérias gram positivas e gram negativas, incluindo a *E. coli* (FOURMY et al., 1996). Alguns mecanismos de resistência da bactéria incluem alterações do ribossomo, redução da permeabilidade, inativação por enzimas, entre outros (RAMIREZ; TOLMASKY, 2011). A PM, quando administrada via oral, é pouco absorvida pelo trato gastrointestinal e o fármaco é eliminado quase 100% pelas fezes (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2008).

Em 2006, na Índia, o uso de PM no tratamento contra LV foi legalizado, uma vez que a administração de  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  desse fármaco, por 21 dias, proporcionou 94% de eficácia no tratamento. Entretanto, para a LC, o tratamento utilizando esse fármaco precisa ser melhorado, uma vez que o uso tópico apresenta desvantagens, como a rápida perda do fármaco no sítio de ação, baixa efetividade contra os parasitas e baixa absorção pela pele (SUNDAR et al., 2007).

O principal desafio na formulação contra a LC é encontrar uma forma eficiente de administração do fármaco, uma vez que o parasita se instala no interior do macrófago e, portanto, as drogas leishmanicidas devem alcançar o interior dessas células para serem capazes de eliminar esse patógeno (JAIN; JAIN, 2013). Sendo assim, um sistema de liberação de fármacos é uma alternativa promissora para contornar tal problema. Diversos materiais, como micro e nano partículas, lipossomas, nanotubos de carbono, entre outros, estão sendo amplamente estudados para

encapsulação de fármacos passíveis de serem fagocitados, atingindo, assim, o nível intracelular (JAIN; JAIN, 2013).

### 1.3. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

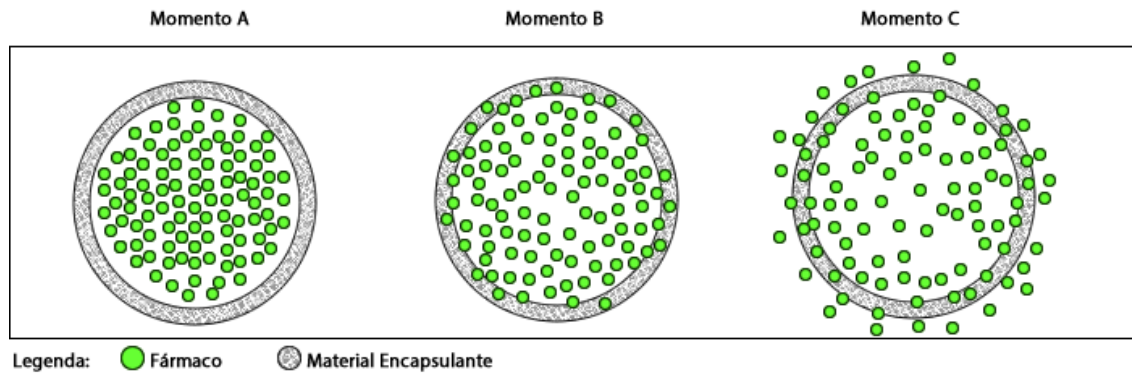
Sistemas de liberação controlada (SLC) vêm sendo amplamente estudados e há um crescente uso em aplicações comerciais, devido aos inúmeros benefícios que oferecem quando comparados aos sistemas convencionais (SMALL; DUBOIS, 2007; RAO; PRESTIDGE, 2016). Sua utilização é bastante dinâmica, sendo aplicados em fertilizantes, agrotóxicos, fragrâncias, fármacos etc. Em relação à liberação de fármacos, os aspectos positivos dos SLC incluem aumento da eficácia do tratamento, redução da toxicidade do fármaco e comodidade para o paciente (UHRICH et al., 1999; FERNANDES; CORREIA, 2015).

As vantagens da utilização dos SLC estão relacionadas ao controle dos níveis de fármacos em determinado intervalo de tempo e ao direcionamento do fármaco no local desejado (diminuindo, assim, os efeitos adversos em outros órgãos e menor número de dosagens) (UHRICH et al., 1999). Outro aspecto positivo é a proteção do composto, assegurando suas propriedades físico-químicas, uma vez que o medicamento *in vivo* está exposto à rápida decomposição, devido às condições fisiológicas como pH e ação enzimática (LANGER, 1998; TIBBITT; DAHLMAN; LANGER, 2016). Além disso, o uso de sistemas carreadores pode superar a problemática da precipitação do fármaco em meio aquoso, melhorando a solubilidade da droga (SANTOS et al., 2018).

Os métodos de liberação de fármacos visam a controlar a distribuição, a concentração e o tempo que esses compostos passam no organismo (UHRICH et al., 1999). Alguns autores classificam os SLC baseados no mecanismo de liberação controlada do fármaco incorporado. Os principais SLC são divididos em: sistemas de difusão controlada (reservatórios ou matrizes), sistemas quimicamente controlados e sistemas controlados pela interação com o solvente. (LANGER, 1998; TIBBITT; DAHLMAN; LANGER, 2016).

Nos sistemas reservatórios, há um núcleo contendo o fármaco que é circundado por uma matriz encapsulante, por onde os compostos serão difundidos para que ocorra a liberação (LANGER, 1998) (Figura 4).

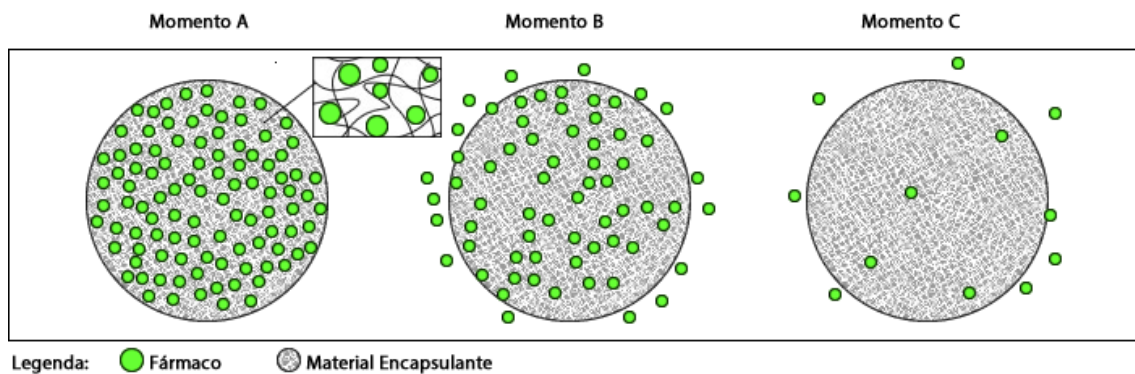
**Figura 4.** Sistema de liberação – Reservatório.



Fonte: Adaptado de LANGER, (1998)

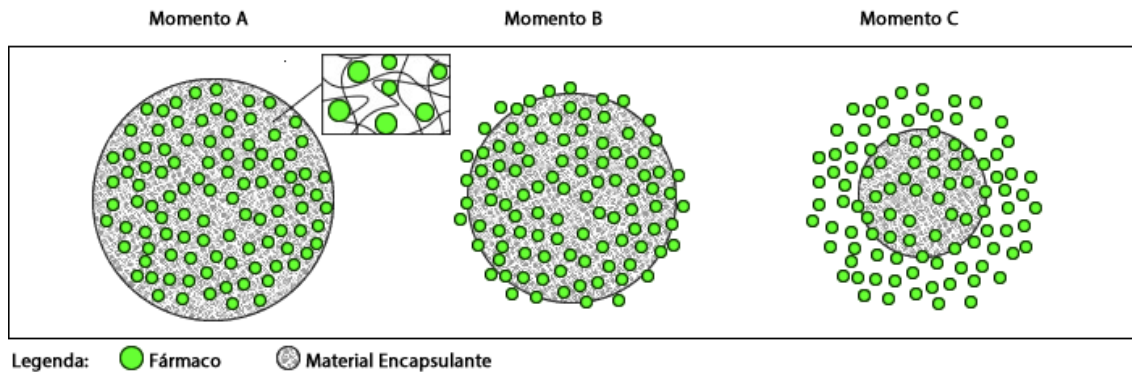
Nos sistemas matriciais, a droga também é liberada por difusão para fora da matriz, porém, diferentemente dos sistemas reservatórios, os fármacos estão distribuídos homogeneamente neles, ou seja, fazem parte de sua composição (Figura 5). Alguns sistemas matriciais são biodegradáveis e sua liberação está relacionada, além da difusão, com a taxa de biodegradação do material (LANGER; PEPPAS, 1981; BIZERRA; SILVA, 2016) (Figura 6).

**Figura 5.** Sistema de liberação - Matricial.



Fonte: Adaptado de LANGER, (1998).

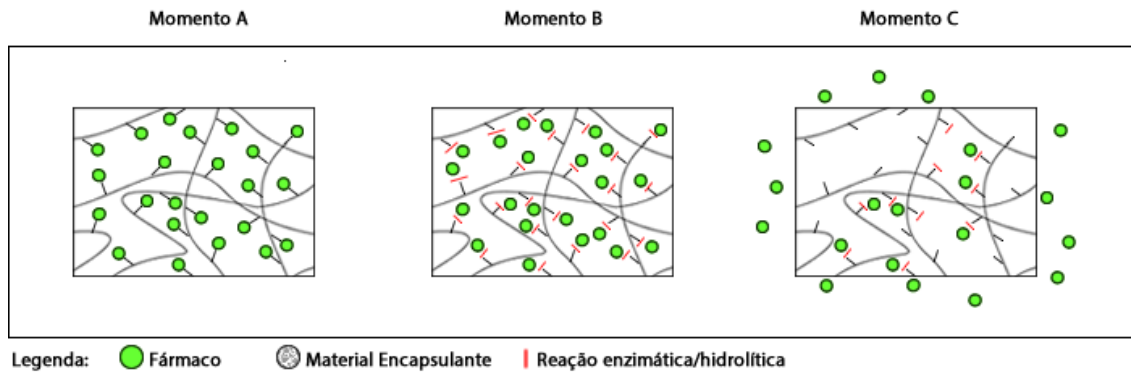
**Figura 6.** Sistema de liberação - Matricial com degradação.



Fonte: Adaptado de LANGER,(1998).

Existem ainda sistemas em que os fármacos estão ligados quimicamente com às cadeias principais da matriz, podendo ser liberado pela ação de enzimas específicas (LANGER; PEPPAS, 1981; BIZERRA; SILVA, 2016) (Figura 7).

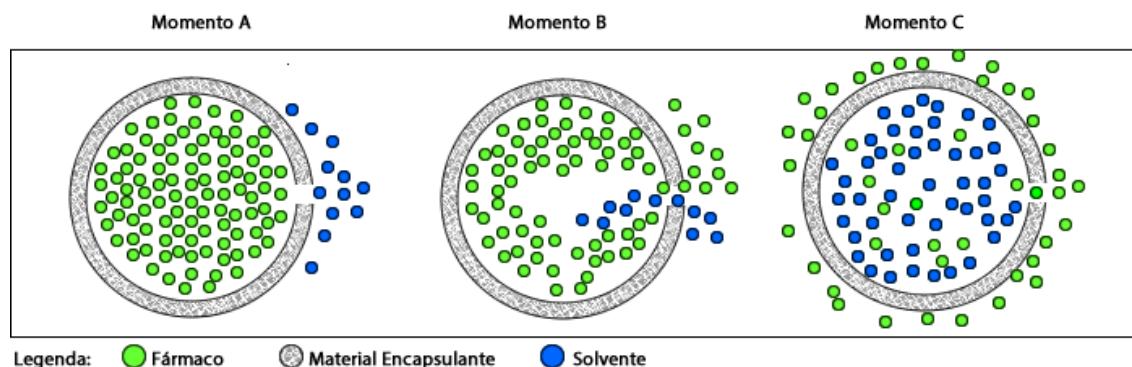
**Figura 7.** Sistema de liberação - Ligação Química.



Fonte: Adaptado de LANGER, (1998)

Por último, há sistemas de liberação controlados por solventes, nos quais o fluxo do solvente irá alterar as propriedades físicas da matriz, ocasionando mudança na taxa da liberação do composto (LANGER; PEPPAS, 1981; BIZERRA; SILVA, 2016) (Figura 8).

**Figura 8.** Sistema de liberação - Solvente.



Fonte: Adaptado de LANGER, (1998)

Em relação às diferentes vias de administração, a via oral ainda é a mais utilizada para administração dos medicamentos. No entanto, o uso de SLC transdérmicos vem sendo estimulado, devido ao aumento de pesquisas para esse tipo de administração (KHATRI et al., 2018). Implantes subdérmicos, microesferas injetáveis, aparato intrauterino e esteróides contraceptivos com liberação via implante subdérmico também já são comercializados (PRAUSNITZ; LANGER, 2008).

Materiais como hidrogéis, polímeros absorvíveis e lipossomas já são amplamente pesquisados como carreadores para esses SLC de fármacos (LI et al., 2014; ZHU; LIAO, 2015).

### 1.3.1. Matrizes em SLC

O desenvolvimento de diferentes materiais e a incorporação da nanotecnologia, no que se refere ao estudo do tamanho e formato das partículas, têm ampliado o desenvolvimento de novos SLC. Polímeros e lipossomas são os materiais mais aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o comércio de diferentes formulações (ZHANG; CHAN; LEONG, 2013).



### 1.3.1.1. Polímeros e PLGA (poli (ácido láctico-co-glicólico))

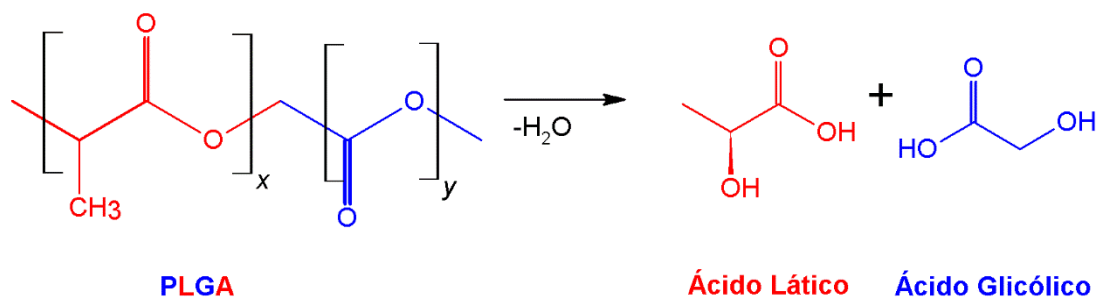
Os polímeros são um dos materiais mais estudados para sistemas de liberação, pois há uma grande versatilidade nas características térmicas, mecânicas e químicas, de acordo com a sua composição (DANHIER et al., 2012). Na área médica, um exemplo de material alvo de interesse dos fabricantes de tecnologias são os polímeros reabsorvíveis, que incluem o PLGA (poli (ácido láctico-co-glicólico), Polihidroxialcanoato e o Policaprolactona. Esses materiais apresentam vantagens como biocompatibilidade e reabsorção pelo próprio corpo, tornando-os uma opção interessante para implantes, pois uma vez implantados não será necessária uma segunda cirurgia para a remoção dos mesmos. Já usados como parafuso ósseo e placa de fixação óssea, eles vêm sendo estudados e utilizados como carreadores de fármaco (DAVISON et al., 2018).

Materiais poliméricos são compostos de alta massa molar, caracterizados pela repetição de unidades moleculares. Essas unidades, chamadas de monômeros, são conectadas por ligações covalentes. Monômeros iguais ligados em cadeia são chamados de homopolímeros e monômeros diferentes ligados em cadeia, de dois tipos, são chamados de copolímeros (CANEVALORO JR., 2010).

Polímeros bioreabsorvíveis são polímeros que podem ser degradados em compostos metabolizáveis em sistemas biológicos e que são completamente eliminados por diferentes vias naturais (VERT et al., 1992; MOTTA; DUEK, 2006). Por tal razão, esses polímeros são biocompatíveis e atóxicos, sendo extremamente úteis em SLC.

O PLGA é um copolímero bioreabsorvível e biodegradável sintético que apresenta monômeros derivados de ácido láctico e glicólico em sua composição. Suas características físico-químicas são flexíveis, pois variam de acordo com a porcentagem de cada monômero, tornando a copolimerização um processo vantajoso na regulação da taxa de liberação de determinado composto (GRACIA et al., 2018). Adicionalmente, oferecem boa proteção contra instabilidade química, são ambientalmente seguros, podendo melhorar as especificidades de superfície para elementos biológicos e causando resposta inflamatória mínima *in vivo*. Em sistemas biológicos, a degradação do PLGA ocorre, principalmente, devido à hidrólise das ligações éster (Figura 9) (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2006).

**Figura 9.** Degradação de PLGA – Hidrólise



Fonte: Adaptado de KUMARI; YADAV; YADAV, (2010).

Esse copolímero foi primeiramente usado como sutura clínica, devido às suas características (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005). Depois disso, o PLGA foi aprovado pela agência federal americana FDA como carreador de fármaco e material de sustentação na engenharia de tecidos (DING; ZHU, 2018). Atualmente, partículas de PLGA estão sendo usadas como sistemas de transporte para mais de 10 moléculas aprovadas pela FDA, no entanto, são necessárias mais pesquisas para elucidar o carregamento de macromoléculas e otimizar as características da liberação controlada, de acordo com o tratamento e com os fármacos utilizados (ZHANG; CHAN; LEONG, 2013; ZHU; LIAO, 2015).

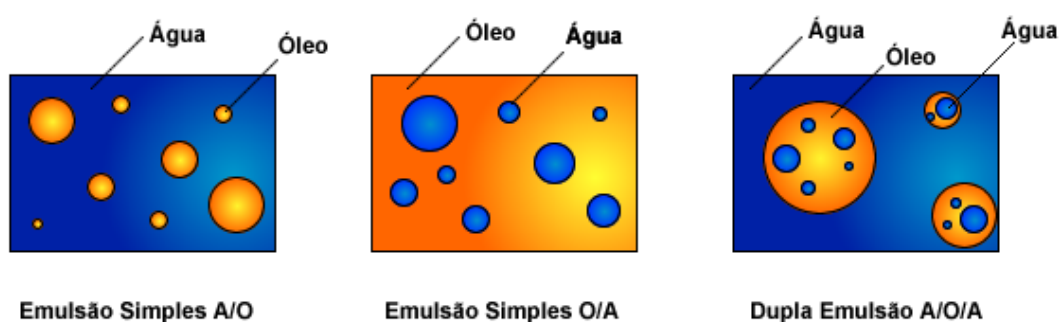
As partículas de PLGA são obtidas por meio de técnicas de microencapsulação de fármacos, que consistem, basicamente, em revestir partículas sólidas, gotas de líquido ou gases com material encapsulante (DING; ZHU, 2018). Nano e micropartículas de polímero são de grande interesse para a indústria farmacêutica, para encapsulamento de diferentes compostos, devido à eficiência de encapsulação de fármacos de natureza hidrofóbica, boa estabilidade e liberação no local alvo, garantindo melhor biodisponibilidade e solubilidade (ANWER et al., 2016). Também possuem outras vantagens, tais como fabricação de tamanho e forma uniformes, maior área de superfície (possibilitando revestimentos terapêuticos) e controle na taxa de degradação. Além disso, podem ser administradas por ingestão ou de forma injetável (JING et al., 2017; WANG; QU; CHOI, 2017).

### 1.3.1.1.1. Microencapsulação e microesferas

As micropartículas são estruturas sólidas e esféricas de tamanho entre 1 a 1000  $\mu\text{m}$ . As micropartículas são subdivididas em microesferas ou microcápsulas, de acordo com o seu sistema de liberação (item 1.3). São denominadas microcápsulas aquelas que utilizam o sistema reservatório (Figura 4) e microesferas, quando utilizam o sistema do tipo matricial (Figuras 5 e 6) (SILVA et al., 2003).

Existem diversas metodologias de obtenção de microesferas, sendo *spray-drying* (DAS et al., 2011), polimerização (CHANDNA et al., 2013) e emulsão por evaporação de solvente (PUROHIT; GARUD, 2019) algumas delas. A técnica de emulsão por evaporação de solvente consiste em formar micropartículas a partir de uma emulsão, na qual as microgotas da solução interna são solidificadas. São divididas em emulsão simples (W/O, do inglês water/oil) e dupla emulsão (W/O/W, do inglês water/oil/water), sendo a escolha entre eles dependente principalmente da hidrofobicidade do fármaco (Figura 10). Na emulsão simples, o polímero é dissolvido em um solvente orgânico volátil, pouco miscível em água, normalmente o diclorometano (DCM) juntamente com o fármaco. Em seguida, essa solução é emulsificada em uma fase aquosa contendo tensoativo, sendo o mais utilizado o poli(álcool vinil) (PVA, do inglês poly(vinylalcohol)). Após esse processo, a emulsão é mantida sob agitação por algumas horas para a evaporação do solvente, e em seguida, esse material é liofilizado (BHATTACHARYA; MUKHOPADHYAY, 2016; DING; ZHU, 2018).

**Figura 10.** Diferentes tipos de emulsão



Fonte: Adaptado de HE et al., (2015) e BASTO et al., (2016)

A técnica de dupla emulsão (W/O/W) foi desenvolvida para encapsular compostos hidrofílicos, sendo que o composto é dissolvido em uma solução aquosa e essa solução é adicionada a um solvente orgânico para formar a primeira emulsão (W/O). Ela é, então, misturada a outra solução aquosa contendo PVA (W/O/W), sendo a partir desse ponto similar ao método de simples emulsão. O tamanho das partículas é influenciado, significativamente, pela viscosidade das soluções, velocidade de agitação, tipo e concentração do estabilizador de suspensão e homogeneização das emulsões (DING; ZHU, 2018).

Em relação aos SLC utilizando microesferas de PLGA, a taxa de liberação dos fármacos encapsulados depende tanto das propriedades físico-químicas do próprio fármaco quanto do polímero. Os principais fatores em relação ao polímero que alteram essa taxa são: hidrofobicidade, massa molar, cristalinidade e composição do copolímero. Já as propriedades físico-químicas das microesferas encapsuladas, que alteram o perfil de liberação estão ligadas a forma geométrica, tamanho, área superficial, porosidade, eficiência de encapsulação, interação entre o fármaco e o polímero e distribuição do fármaco na matriz polimérica (MORAIS, 2010).

Existem casos em que o fármaco precisa ser direcionado exatamente para o macrófago, como por exemplo, no tratamento da tuberculose e leishmaniose, assim como no direcionamento de vacinas (HIROTA et al 2007, MOMENI *et al.*, 2013). Independentemente do tipo de aplicação que se procura fazer a partir dos SLC, as informações sobre as características da partícula relacionadas à forma como a fagocitose ocorre são de extrema importância para algumas doenças (TABATA; IKADA, 1988).

Um dos fatores que mais influenciam a fagocitose de microesferas poliméricas é o tamanho que elas possuem. De acordo com Champion e colaboradores (2008), macrófagos possuem receptores capazes de reconhecer uma ampla faixa de moléculas estranhas e conseguem reconhecer partículas-alvo pelo seu tamanho, ou seja, são capazes não só de um reconhecimento químico, mas também realizam um reconhecimento por características físicas. Ainda segundo este estudo, as partículas mais fagocitadas estão compreendidas em uma faixa de 2 - 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Desse modo, torna-se clara a importância do tamanho da microesfera e da fagocitose para o processo de liberação de fármacos, principalmente quando esses

últimos necessitam ser internalizados por macrófagos para surtirem efeito (CHAMPION; WALKER; MITRAGOTRI, 2008).

#### 1.4. DESAFIOS NA DETERMINAÇÃO DE AMINOGLICOSÍDEOS EM SLC

Para avaliar o perfil de liberação e a eficiência de encapsulação, em SLC, de aminoglicosídeos é necessária a utilização de um método de análise capaz de separar e quantificar esses analitos. No entanto, isso é um desafio, devido à natureza complexa da mistura desses antibióticos, com os componentes diferindo apenas pelo grau e orientação da metilação (STEAD; RICHARDS, 1996). Além disso, a ausência de grupos cromofóros em sua estrutura faz com que sua absorbância na região do UV-vis seja baixa (FAROUK; AZZAZY; NIESSEN, 2015). Se houver a presença de dois ou mais aminoglicosídeos na mistura, apenas técnicas de separação são capazes de quantificar seus componentes individuais. A maioria dos trabalhos publicados com esse objetivo utilizam como técnica de análise a cromatografia de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) (GUBERNATOR; DRULIS-KAWA; KOZUBEK, 2006; YANG et al., 2017).

A HPLC é uma das técnicas de separação mais utilizadas na análise de compostos não voláteis (LANÇAS, 2009). A separação dos analitos ocorre da seguinte maneira: uma bomba de alta pressão aspira um solvente (também chamado de fase móvel) e a amostra em direção à coluna (fase estacionária). Essas fases podem ser de diferentes materiais e são escolhidas de maneira que os analitos se distribuam com diferentes intensidades entre a fase móvel e a fase estacionária, fazendo com que ocorra a separação dos mesmos (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Para fins de identificação e quantificação, diferentes detectores podem ser utilizados, dependendo das características dos analitos. Para a maioria das aplicações em HPLC descritas na literatura (STEAD, 2000), a determinação de aminoglicosídeos requer uma etapa de derivatização para produzir adutos que apresentem características compatíveis com os detectores mais comumente utilizados nos laboratórios. Apesar da popularidade, a HPLC apresenta como principais desvantagens longos tempos de análise, uso de volumes consideráveis de solventes, colunas específicas e alto custo de instrumentação e operação.

Uma alternativa à HPLC é a eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*), que apresenta como vantagens rapidez, uso de volume reduzido de

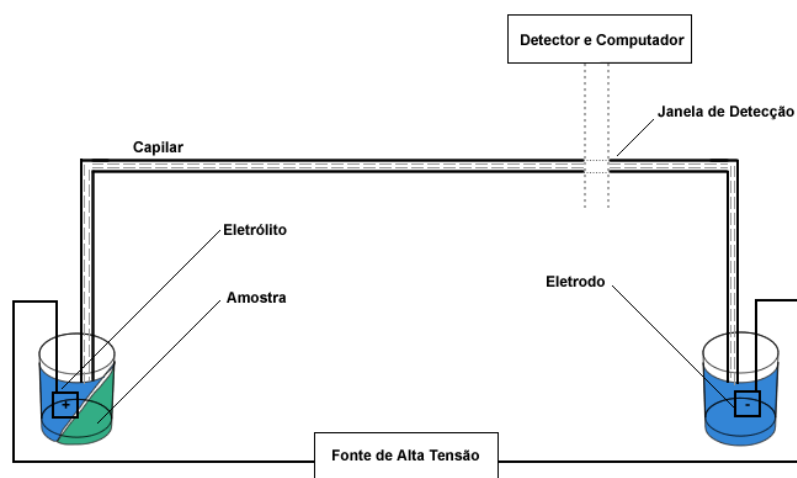
amostra e solventes, não requerendo o uso de colunas específicas, além de baixo custo por análise em comparação a outras técnicas (JAGER; TAVARES, 2001). Por esse motivo, o desenvolvimento de novas metodologias e/ou a otimização de metodologias já existentes em CE para determinação de aminoglicosídeos podem ser uma alternativa viável, simples e de menor custo para as análises de rotina.

### 1.5. ELETROFORESE CAPILAR

A CE é uma técnica de separação versátil, baseada no fenômeno de movimentação de partículas carregadas eletricamente ou moléculas ionizáveis em uma solução condutora presentes no interior de um capilar sob influência de um campo elétrico (PEDROSO et al., 2019; BAKER, 1995). Foi em 1937 que Tiselius usou tal fenômeno como técnica de separação, mas foi somente em 1967 que Hjertén introduziu o uso de tubos abertos e em 1980 que Jorgenson e Lukacs tornaram a CE mais popular, com o uso de capilares de sílica fundida de 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno (FRENZ; HANCOCK, 1991).

Essa técnica utiliza um sistema que consiste em uma coluna capilar, reservatórios para o eletrólito, uma fonte de alta tensão, eletrodos de platina e um detector (Figura 11). Uma coluna capilar é preenchida com uma solução condutora, conhecida como eletrólito de corrida, que serve como um canal para migração das espécies. Essa coluna pode variar de diâmetro e comprimento e suas extremidades encontram-se submersas em reservatórios contendo o eletrólito de corrida. A fonte de alta tensão está conectada aos reservatórios pelos eletrodos de platina. O sistema possui um detector conectado a um computador, que dispõe de um *software* para aquisição e tratamento dos dados. Em equipamentos comerciais, a coluna capilar é acondicionada dentro de um cartucho mantido a temperatura controlada. O controle de temperatura do sistema pode ser feito pela circulação de um líquido ou ar (TAVARES, 1997).

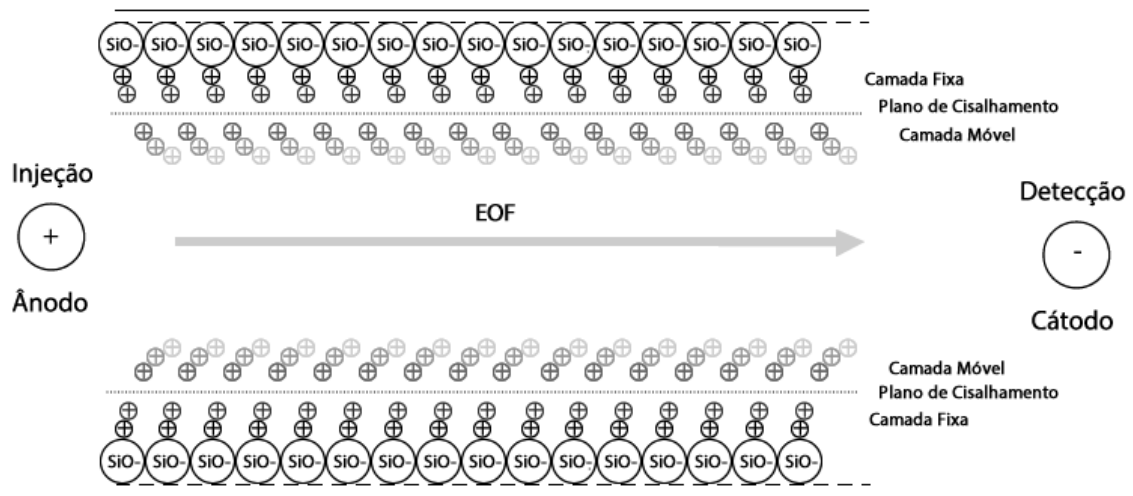
**Figura 11.** Esquema de um sistema de CE



Fonte: Adaptado de BAKER, (1995)

Nesse sistema, a aplicação da tensão ao longo do capilar de sílica fundida, preenchido com um eletrólito, gera um fluxo na solução dentro da coluna, que é conhecido como fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *electroosmotic flow*), que faz com que a mistura presente na solução migre com determinada velocidade (ALTRIA, 1996). O EOF é gerado devido aos grupos silanóis (Si-OH), presentes na superfície da parede do capilar de sílica fundida. Quando o capilar é preenchido com eletrólito de  $\text{pH} > 3$  esses grupos sofrem ionização e se tornam carregados negativamente. Quando o eletrólito é introduzido na coluna, os cátions contidos nessa solução são atraídos pelos ânions presentes nas paredes do capilar, gerando duas camadas de cátions em sua parede. A camada mais próxima da parede do capilar é chamada de fixa e a camada mais externa é chamada de móvel. Quando um campo elétrico é aplicado ao longo do capilar, um movimento é gerado na camada móvel em direção ao eletrodo negativo. Durante o processo de migração, os cátions transportam moléculas de água, induzindo um fluxo da solução como um todo, como representado na Figura 12 (BAKER, 1995; TAVARES, 1997)

**Figura 12.** Fluxo eletrosmótico (EOF)



Fonte: Elaborado pelo autor.

A velocidade do EOF é determinada por uma série de fatores, tais como a espessura da dupla camada difusa, a carga por unidade de área, a constante dielétrica, a viscosidade do eletrólito e o próprio campo elétrico aplicado na solução, como mostra a equação 1. O potencial zeta é o potencial que surge no plano de cisalhamento (distância em que a camada móvel não sofre mais influência das forças atrativas da parede do capilar) e é determinado pela espessura da dupla camada difusa, carga por unidade de área e constante dielétrica (BAKER, 1995; ALTRIA, 1996).

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta E}{4\pi\eta} \quad (1)$$

Onde:

$v_{EOF}$  = Velocidade do fluxo eletrosmótico;  $\zeta$  = potencial zeta;  $\eta$  = viscosidade do eletrólito;  $\varepsilon$  = constante dielétrica do eletrólito;  $E$  = Campo elétrico em volts/cm.

### 1.5.1. Modos de Operação

A CE é uma técnica altamente versátil, em relação às outras técnicas de separação, com diversos modos de operação. Esses modos são selecionados de acordo com a demanda do problema analítico em questão.

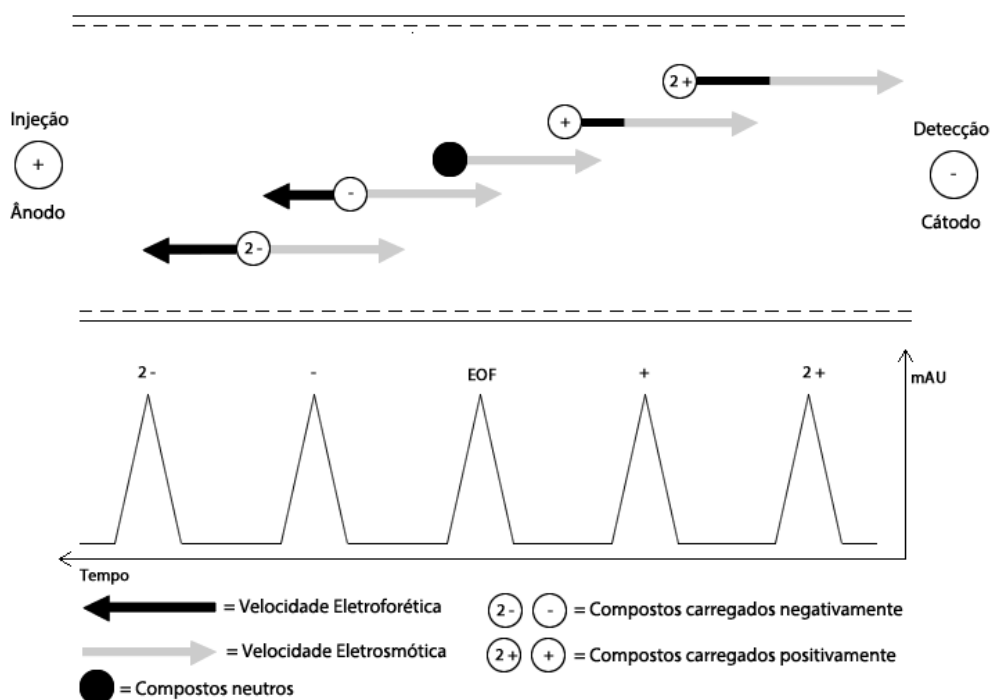


### 1.5.1.1. Eletroforese capilar em Solução Livre

Esse é o modo mais simples da CE, no qual os compostos iônicos ou ionizáveis movem-se no capilar devido à soma vetorial da mobilidade eletroforética e eletrosmótica (WHATLEY, 2001). Portanto, a separação dos compostos ocorre devido à diferença entre a mobilidade de cada analito (ALTRIA, 1996).

Normalmente, os solutos são transportados ao longo da coluna em direção ao detector. Os solutos carregados positivamente migram em direção ao eletrodo negativo, no mesmo sentido que o fluxo (fluxo normal). Os solutos carregados negativamente migram no sentido contrário ao EOF, entretanto, se a mobilidade do soluto for menor que a força de arraste do EOF, esses solutos serão arrastados em direção do detector. A desvantagem dessa técnica é que todos os solutos neutros são arrastados pelo EOF, mas sem que haja distinção entre os analitos (BAKER, 1995). A Figura 13 representa a separação sob o fluxo normal no modo em solução livre (FSCE, do inglês *free-solution capillary electrophoresis*).

**Figura 13.** Esquema de separação do modo FSCE

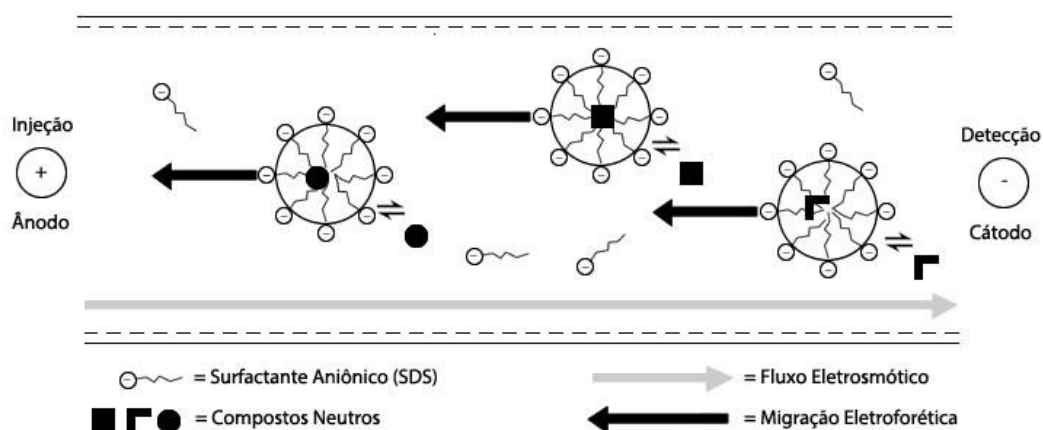


Fonte: Adaptado de HOLLER; SKOOG; CROUCH, (2009).

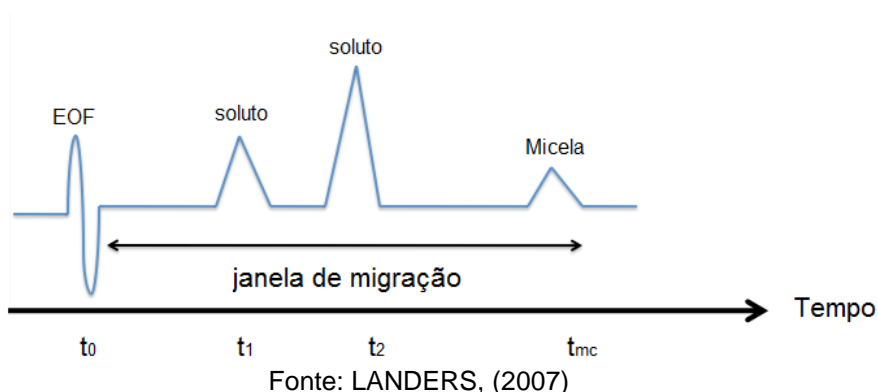
### 1.5.1.2. Cromatografia Eletrocinética Micelar

Na FSCE não é possível separar os analitos neutros, uma vez que esses compostos se movem somente devido ao EOF, como não existe diferenciação de migração entre os diferentes solutos neutros, eles são detectados como se fossem um único composto. Para separá-los é necessário o uso de agentes químicos (tensoativos), que são responsáveis pelo transporte e separação desses compostos ao longo do capilar. Terabe e colaboradores desenvolveram um modo capaz de causar diferentes migrações de compostos neutros usando micelas, chamado de cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, do inglês *Micellar electrokinetic chromatography*) (TERABE, 2010). Essas micelas são formadas pela adição de tensoativos iônicos, acima de sua concentração crítica micelar, ao eletrólito de corrida. Com a adição do tensoativo no eletrólito, forma-se duas fases (eletrólito e micelas) e os solutos permanecem distribuídos entre elas. O analito irá se mover com a mesma velocidade da micela quando ele estiver no interior da mesma, e irá se mover com a velocidade do fluxo eletrosmótico (EOF) quando estiver em solução aquosa. A velocidade de migração depende do coeficiente de distribuição do analito entre as fases aquosa e micelar (LANDERS, 2007) (Figura 14). Sendo assim, esses compostos vão migrar dentro de uma janela entre o EOF e as micelas (Figura 15).

**Figura 14.** Esquema de separação dos analitos em MEKC



Fonte: adaptado de LANDERS, (2007)

**Figura 15.** Esquema da janela de migração dos solutos em MEKC

### 1.5.2. Detecção

Diversos detectores estão disponíveis para os equipamentos de CE e as quatro modalidades mais utilizadas são: absorvância, fluorescência, eletroquímica e índice de refração (SWINNEY; BORNHOP, 2000). Além desses, outros detectores como os espectrômetros de massas e os detectores de condutividade vêm sendo bastante utilizados. O detector deve ser escolhido de acordo com as características do composto analisado, nível de sensibilidade desejado e levando em consideração as condições do laboratório de análise. O Quadro 3 apresenta uma compilação das diferentes técnicas de detecção em CE.

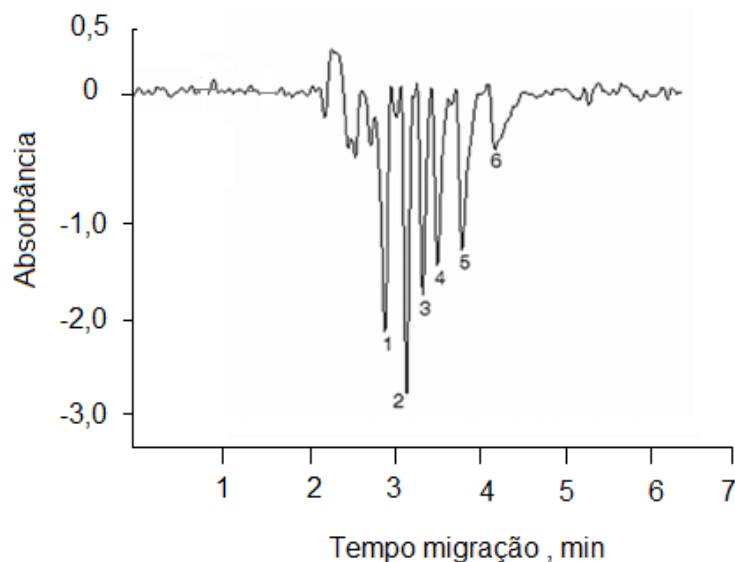
**Quadro 3.** Limites de detecção para diferentes técnicas de detecção em CE

Tipo de detecção	Limite de detecção (mol L <sup>-1</sup> )	Observações
Absorbância direta	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-6</sup>	Caminho óptico padrão
	10 <sup>-6</sup>	Caminho óptico estendido
Absorbância indireta	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-6</sup>	-
Fluorescência induzida por laser (LIF)	< 10 <sup>-13</sup>	Uso de derivatização
Fluorescência	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-9</sup>	Uso de derivatização
LIF indireto	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-7</sup>	-
Condutividade	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-8</sup>	-
Amperiométrico	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-8</sup>	-
Índice de refração	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-6</sup>	Capilar
	10 <sup>-5</sup>	Escala de chip
Raman	10 <sup>-3</sup> – 10 <sup>-6</sup>	Uso de pré-concentração
Espectrômetro de massas	10 <sup>-8</sup> – 10 <sup>-10</sup>	-

Fonte: SWINNEY; BORNHOP, (2000)

A maioria dos equipamentos de CE disponíveis no mercado são equipados com detectores na região do UV-vis, devido ao custo e simplicidade, no entanto, a utilização desse detector é inviável para a análise direta de substâncias que não possuem absorvância, sendo necessária uma etapa de derivatização ou a utilização da detecção indireta (UNDERBERG; WATERVAL, 2002; NAVARRO-PASCUAL-AHUIR et al., 2017). A derivatização consiste na reação entre os analitos de interesse e um agente derivatizante para formar espécies (adutos), com características necessárias para sua detecção (UNDERBERG; WATERVAL, 2002). A outra ferramenta utilizada em CE, para espécies que não apresentam características de absorção na região do UV-vis, é a detecção indireta, que utiliza um eletrólito de corrida que possui absorção em algum comprimento de onda específico. Portanto, no momento em que os analitos se deslocam para a janela de detecção, a absorvância do sistema decresce, gerando picos negativos, referente aos analitos de interesse sendo que o sinal do pico pode ser invertido com softwares apropriados para facilitar sua visualização e análise (Figura 16) (VOLPI, 2011).

**Figura 16.** Esquema do eletroferograma típico resultante da detecção indireta



Fonte: VAHER et al., (2007)

## 1.6. MÉTODOS PARA ANÁLISE DE AMINOGLICOSÍDEOS UTILIZANDO A ELETROFORESE CAPILAR

Os primeiros trabalhos descritos na literatura utilizando a CE para a separação de AG foram baseados em métodos de detecção direta (195 nm) e métodos de detecção indireta. Ackermans e colaboradores (1992) propuseram duas formas de separar alguns AG por detecção indireta. Os melhores resultados foram obtidos utilizando o modo de separação FSCE, com o eletrólito contendo 0,01 mol L<sup>-1</sup> de imidazol e FC 135 (inversor de fluxo, do inglês, *fluorochemical surfactant FC 135* 50 pg mL<sup>-1</sup>) em pH 5,0 ajustado com ácido acético. A separação foi feita em uma coluna de 67 cm (60 cm efetivo) x 50 µm e uma tensão aplicada de 12,5 kV. Os autores calcularam a mobilidade efetiva de 13 AG, entre os quais PM, GM, amicacina (AM), tobramicina (TM) e neomicina (NM). No entanto, o eletroferograma apresentado nesse trabalho resultou em apenas 6 AG separados e com um único pico para cada composto. Ainda nesse trabalho, foi desenvolvido outro método para demonstrar a separação dos AG, juntamente com compostos neutros (paracetamol e dapsona). A separação ocorreu por MECK, utilizando como eletrólito de corrida uma mistura contendo 0,01 mol L<sup>-1</sup> de imidazol, 50 pg mL<sup>-1</sup> de FC 135 e 100 mmol L<sup>-1</sup> de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) em pH 5. Para essa separação, as condições instrumentais foram as mesmas, com exceção da tensão aplicada, que foi de 15 kV.

Outro método descrito, com detecção indireta para separação de NM e polimixina B, utilizou um eletrólito contendo 15 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato, 40 mmol L<sup>-1</sup> de 4-hidroxi-fenil acetamida, 50 mmol L<sup>-1</sup> de brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB), pH 5,0. A separação foi conduzida em capilar de 27 cm (20 cm de comprimento efetivo) x 50 µm de diâmetro interno e injeção de 34,5 mbar x 5 s com tensão aplicada de 6 kV e temperatura de separação de 25 °C (SRISOM et al., 2007).

Flurer e Wolnik (1994) e Flurer (1995) avaliaram a separação de GM e outros 11 AG por detecção direta (195 nm), utilizando a complexação com borato (TBS), que consiste em transformar os AG em complexos carregados negativamente. A separação da GM e seus derivados foi conduzida em capilar de sílica, com 70 cm de comprimento (45 até o detector) x 50 µm de diâmetro interno. O eletrólito era constituído de 150 mmol L<sup>-1</sup> de borato, pH 9,4. A tensão aplicada foi de 15,0 kV e a temperatura foi mantida em 34 °C. Entretanto, esse método não foi validado para a

GM e o sistema de separação apresentado no trabalho de Flurer e Wolnik (1994) mostrou a separação dos picos com uma concentração de 1510 mg L<sup>-1</sup>.

A separação dos componentes da GM em C<sub>1</sub>, C<sub>1a</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>2a</sub> e C<sub>2b</sub>, utilizando detecção direta (195 nm), foi alcançada somente no trabalho de Curiel e colaboradores (2007), com um eletrólito de corrida constituído de 0,35 mmol L<sup>-1</sup> de CTAB, 3 % de metanol (MeOH) e 90 mmol L<sup>-1</sup> de ácido orto-fosfórico, pH 7,4. As condições instrumentais utilizadas foram: capilar de sílica de 40,2 cm (30 cm de efetivo) x 75 µm de diâmetro interno, injeção hidrodinâmica de 55 mbar x 10s, tensão aplicada de -6 kV e a temperatura de 30 °C. Para o desenvolvimento do método, os autores utilizaram planejamento fatorial e investigaram a influência do pH, concentração de pirofosfato e concentração de MeOH. Os valores do coeficiente de variação (CV) foram inferiores a 5 % para repetibilidade e 8,4 % para precisão intermediária. Os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) para gentamicina total foram 0,67 e 2,09 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente.

Kaale e colaboradores (2000) desenvolveram um método em FSCE utilizando a derivatização com o-ftalaldeído (OPA, do inglês *o-phthalaldehyde*) e ácido mercaptoacético (MAA) para análise de GM. Nesse trabalho, os autores descrevem um método para determinação de todos os componentes da GM. As condições otimizadas foram: eletrólito contendo 30 mmol L<sup>-1</sup> de tetraborato de sódio (TBS), 7,5 mmol L<sup>-1</sup> de β-ciclodextrina (β-CD) e 12,5 % de MeOH) pH 10,0, capilar de sílica de 40 cm (33,7 cm de comprimento efetivo) x 50 µm de diâmetro interno, injeção de 55,8 mbar x 4 s, tensão aplicada de 15 kV e temperatura de 25 °C. Cabe mencionar que o processo de derivatização utilizado neste trabalho é complexo e necessita de várias etapas, como aquecimento, ajuste de pH e utilização de solventes orgânicos. Outro trabalho do mesmo autor utilizou condições similares ao trabalho descrito acima para a derivatização e determinação de outros AG, no qual os componentes A, B, C e D da canamicina foram separados utilizando um eletrólito contendo 30 mmol L<sup>-1</sup> de TBS e 16% MeOH, pH 10,0 (KAALÉ et al., 2001) e um novo método para separação de TM, neomicina A e canamicina B foi proposto utilizando um eletrólito contendo 30 mmol L<sup>-1</sup> de TBS e 25 % de acetonitrila (ACN), pH 10,2 (KAALÉ et al., 2002).

Os efeitos da β-CD, MeOH, pH, concentração de TBS no eletrólito, concentração de OPA, tempo e temperatura da reação de derivatização foram investigados no trabalho de Wienen e Holzgrabe (2002), utilizando o modo FSCE na

quantificação de PM. As condições de separação estão descritas no Quadro 4. Os melhores resultados para o procedimento de derivatização foram obtidos quando o reagente foi utilizado em excesso de 6 vezes e aquecimento de 60 °C por 5 min. Outro aspecto estudado foi a estabilidade dos adutos formados com OPA. Os resultados obtidos sugerem que o tempo entre a derivatização e a injeção não deve exceder 5 min.

Os mesmos autores propuseram um método utilizando MEKC, com o objetivo de melhorar a separação de alguns AG e suas impurezas em amostras farmacêuticas comerciais (WIENEN; HOLZGRABE, 2003). As condições de separação foram: 100 mmol L<sup>-1</sup> de TBS, 20 mmol L<sup>-1</sup> de desoxicolato de sódio monohidrato (DChol) e 15 mmol L<sup>-1</sup> de β-CD, pH 10,0. As condições instrumentais otimizadas foram: injeção de 50 mbar x 5s, detecção em 340 nm, tensão aplicada de 12 kV e temperatura de 25 °C. A cada duas corridas, a coluna era condicionada com água, NaOH, água, HCl, água e o eletrólito de corrida. Nesse trabalho, foi avaliado o efeito de 10 diferentes ciclodextrinas no sistema de separação e o uso de DChol e tauro-DChol no eletrólito de corrida. Os autores não utilizaram os melhores resultados de concentração para o TBS (125 mol L<sup>-1</sup>) devido à solubilidade, por isso, optaram por usar o TBS na concentração de 100 mol L<sup>-1</sup>. Também foi avaliado o efeito de diferentes solventes orgânicos e variações na temperatura e tensão, mas somente após a mudança de pH para 10,0 é que ocorreu a separação desejada. Esse método foi aplicado em amostras comerciais de gentamicina e foi possível observar a presença de diferentes picos (contaminantes) nessas amostras em comparação com a solução padrão, bem como uma diferença na concentração dos picos majoritários da GM (C<sub>1</sub>, C<sub>1a</sub>, C<sub>2a</sub> e C<sub>2</sub>).

Kühn e colaboradores (2008) utilizaram o método proposto por Wienen e Holzgrabe (2003) para estudar a estabilidade da GM em diferentes sistemas de liberação controlada.

Para analisar a gentamicina em amostras biológicas, Kaale e colaboradores (2005) adaptaram os métodos já descritos na literatura, com ênfase em melhorar as condições de extração e sensibilidade do método. Foram analisados os produtos da reação entre AG e OPA em 230 nm, enquanto em trabalhos anteriores eram utilizados comprimentos de 330 até 340 nm. Outras mudanças foram na coluna capilar utilizada para a separação (50,2 cm (40 cm efetivo) x 75 µm de d.i.) e na utilização de um

eletrólito contendo 60 mmol de ácido 2- (N-ciclo-hexilamino) etanossulfônico (CHES), 31,6 % de MeOH (m/v), pH 9,5.

Outros métodos, utilizando detectores específicos, também foram desenvolvidos. O trabalho de Lin e colaboradores (2008) descreve a utilização de éster succinimidílico de 6-carboxifluoresceína (CFSE, do inglês *6-Carboxyfluorescein succinimidylester*) como agente derivatizante para a detecção de canamicina, bekanamicina, paromomicina e tobramicina, utilizando um detector de fluorescência induzida por laser de íon argônio. As condições otimizadas incluíram o uso de capilar de 50 cm (30 cm de comprimento efetivo) x 50 µm de d.i, tensão aplicada de 8 kV, injeção hidrostática de 3 s e temperatura de 20° C. A derivatização foi feita em pH 9,5 e a concentração do reagente selecionada foi 4 mmol L<sup>-1</sup>.

Moreno-González e colaboradores (2015) quantificaram a presença de aminoglicosídeos (GM, NM, PM, apramicina, di-hidroestreptomicina, espectinomicina e estreptomicina) em amostras de mel, utilizando FSCE com espectrometria de massas. Foram utilizados capilar de sílica de 90 cm de comprimento total x 50 µm de d.i, tensão aplicada de 25 kV, injeção de 90 s x 50 mbar e temperatura constante de 25 ° C, tendo os valores de pH das amostras sido ajustados para 7,0. Os melhores resultados foram obtidos usando ácido fórmico com pH de 2,2 e concentração de 200 mmol L<sup>-1</sup>.

Yu e colaboradores (2019), desenvolveram um método para determinação de AM, apramicina, higromicina B e PM em amostras de leite. As melhores condições para separação dos AG incluíram a utilização de um capilar de sílica de 90 cm de comprimento total x 30 µm de d.i, tensão aplicada de 25 kV, injeção de 60s x 172,4 mbar e temperatura de 25 ° C. O método desenvolvido apresentou LOQ de 0,67 µg·kg<sup>-1</sup> para os quatro analitos de interesse e valores de recuperações variando de 76,2 até 110 %.

O Quadro 4 apresenta um resumo dos métodos para a determinação de AG por CE.



**Quadro 4.** Principais trabalhos publicados entre 1992 e 2019 sobre determinação de AG utilizando CE

Modo	Deteção	Eletrólito	Condições otimizadas	Analito	Referência
FSCE	indireta (214nm)	0,01 mol L <sup>-1</sup> de imidazol e 50 pg mL <sup>-1</sup> de FC 135, pH 5	capilar: 67 cm (60 cm efet.) 50 µm de d.i.; injeção: - mbar x 2 s; tensão: 12,5 kV; temperatura: -	canamicina, tobramicinam, sisomicina e outros	Ackermans et al, 1992
MEKC		0,01 mol L <sup>-1</sup> de imidazol, 50 pg mL <sup>-1</sup> de FC 135 e 100 mmol L <sup>-1</sup> de CTAB, pH 5	capilar: 67 cm (60 cm efet.) 50 µm de d.i.; injeção: - mbar x 5 s; tensão: 15 kV; temperatura: -		
FSCE	direta (195 nm)	140/185 mmol L <sup>-1</sup> de TBS, pH 9,0	capilar: 70 cm (45 cm efet.) x 50 µm de d.i.; tensão: 15 kV; temperatura: 34 °C	gentamicina	Flurer e Wolnik, 1994
FSCE	direta (195 nm)	150 mmol L <sup>-1</sup> de TBS, pH 9,4	capilar: 70 cm (45 cm efet.) 50 µm de d.i.; injeção: 250 mbar s <sup>-1</sup> ; tensão: 15 kV; temperatura: 34 °C	vários	Flurer, 1995
FSCE	OPA (330 nm)	30 mmol L <sup>-1</sup> de TBS, 7,5 mmol L <sup>-1</sup> β-CD, 12,5 % MeOH, pH 10	capilar: 40 cm (33,7 cm efet.) 50 µm de d.i.; injeção: 55,8 mbar x 4 s; tensão: 15 kV; temperatura: 25 °C	gentamicina	Kaale et al, 2000
FSCE	OPA (335 nm)	30 mmol L <sup>-1</sup> de TBS 16% MeOH, pH 10	capilar: 33 cm (24,5 cm efet.) 50 µm de d.i.; injeção: 51,7 mbar x 4 s; tensão: 23,5 kV; temperatura: 20 °C	canamicina	Kaale et al, 2001
FSCE	OPA (335 nm)	30 mmol L <sup>-1</sup> de TBS 25 % ACN, pH 10,2	capilar: 33 cm (24,5 cm efet.) 50 µm de d.i.; injeção: 51,7 mbar x 4 s; tensão: 23,5 kV; temperatura: 20 °C	tobramicina	Kaale, 2002
FSCE	OPA (330 nm)	40 mmol L <sup>-1</sup> de TBS, 3 mmol L <sup>-1</sup> β-CD, 12,5 % MeOH, pH 10	capilar: 33 cm (24,5 cm efet.) 50 µm de d.i.; injeção: 50 mbar x 4 s; tensão: 18 kV; temperatura: 25 °C	paromomicina	Wienen e Holzgrabe, 2002
MEKC	OPA (340 nm)	100 mmol de TBS, 20 mmol L <sup>-1</sup> de DChol e 15 mmol L <sup>-1</sup> de β-CD	capilar: 33 cm (24,5 cm efet.) 50 µm de d.i.; injeção: 50 mbar x 5 s; tensão: 12 kV; temperatura: 25 °C	gentamicina, canamicina e T tobramicina e outros	Wienen e Holzgrabe, 2003

FSCE	OPA (230)	60 mmol de CHES, 31,6 % de MeOH, pH 9,5	capilar: 50,2 cm (40 cm efet.) 75 $\mu$ m de d.i.; injeção: 55 mbar x 10 s; tensão: 23 kV; temperatura: 25 °C	gentamicina	Kaale et al, 2005
FSCE	PGD	0,2 mmol de CTAB, 1 mmol L <sup>-1</sup> de Citrato de amônio, pH 3,5	capilar: 53 cm x 50 $\mu$ m de d.i.; injeção: 20,7 mbar x 10 s; tensão: 15 kV; temperatura: 25 °C	gentamicina	(Yuan et al 2005)
MEKC	Cy5	35 mmol de TBS, 50 mmol L <sup>-1</sup> de SDS e 20 % de ACN, pH 9,2	capilar: 57 cm (50 cm efet) x 50 $\mu$ m de d.i.; injeção: 34,5 mbar x 5 s; tensão: 15 kV; temperatura: 25 °C	canamicina B, amicacina, neomicina B e paromomicina I	Serrano et al, 2006r
MEKC	indireta (280nm)	15 mmol L <sup>-1</sup> de fosfato, 40 mmol L <sup>-1</sup> (4-hidroxi-fenil) acetamida 50 mmol L <sup>-1</sup> de TTAB, pH 5	capilar: 27 (20 cm efet) cm x 50 $\mu$ m de d.i.; injeção: 34,5 mbar x 5 s; tensão: 6 kV; temperatura: 25 °C	neomicina e polimixina B	Srisom et al, 2007
FSCE	direta (195 nm)	0,35 mmol L <sup>-1</sup> de CTAB, 3 % de MeOH e 90 mmol L <sup>-1</sup> de ácido ortho fosfórico, pH 7,4	capilar: 40,2 cm (30 cm efet.) 75 $\mu$ m de d.i.; injeção: 55 mbar x 10 s; tensão: -6 kV; temperatura: 30 °C	gentamicina	Curiel et al, 2007
MEKC	OPA (340 nm)	100 mmol L <sup>-1</sup> de TBS, 20 mmol L <sup>-1</sup> ácidodesoxicólico, 15 mmol L <sup>-1</sup> $\beta$ -CD, pH 10	capilar: 33 cm (24,5 cm efet.) 50 $\mu$ m de d.i.; injeção: 50 mbar x 5 s; tensão: kV; temperatura: 34 °C	gentamicina	Kuhn et al, 2008
FSCE	CFSE(488/520 nm)	30 mmol L <sup>-1</sup> de TBS, pH 10	capilar: 50 cm (30 cm efet.) 50 $\mu$ m de d.i.; injeção: 3s (18 cm); tensão: 8 kV	Canamicina, tobramicina, paromomicina e "bekanamycin"	Lin et al, 2008
FSCE	MS	200 mmol L <sup>-1</sup> de ácido fórmico, pH 2,2	capilar: 90 cm x 50 $\mu$ m de d.i.; injeção: 50 mbar x 90s; tensão: 25kV; temperatura: 25 °C	gentamicina, Paromomicina e outros	Moreno- Gonzalez et al, 2015
CE-ESI	MS	10% HAc	capilar: 90 cm x 30 $\mu$ m de d.i.; injeção: 172,4 mbar x 60s; tensão: 25kV; temperatura: 25 °C	Amicacina, Paromomicina, apramicina e higromicina B	Yu et al, 2019

Legenda: (FC) Surfactante fluoroquímico, (CTAB) brometo de cetiltrimetilamônio, (OPA) Ortoftaldeído, (FSCE) Eletroforese capilar em Solução Livre, (PGD) Detector de gradiente de potencial, (Cy5) Éster sulfoindociamino succinimidil, (ACN) Acetonitrila, (MEKC) Cromatografia Eletrocinetica Micelar (TTAB) Brometo de tetradeciltrimetilamônio, ( $\beta$ -CD)  $\beta$ -ciclodextrina, (CFSE) Succinimidílico de 6-carboxifluoresceína, (CE-ES/MS) Eletroforese capilar acoplada com espectrometria de massas por ionização por electropulverização, (HAc) Ácido Acético (MS) Espectrometria de massas. Fonte: elaborado pelo autor

De acordo com o Quadro 4, é possível observar que a maioria das metodologias desenvolvidas para a determinação de AG se baseia na derivatização com OPA. Não foi encontrada na literatura, a utilização de outros reagentes derivatizantes para CE-DAD comumente utilizados para a derivatização e análise por HPLC-UV. A determinação direta, apesar de reduzir o tempo total de análise, o consumo de reagente e, conseqüentemente, o custo das análises é feita em um comprimento de onda de 195 nm, o que reduz a seletividade e sensibilidade do método. A detecção indireta se mostrou bastante promissora para a determinação dos AG, entretanto, os métodos propostos até o momento utilizaram sistemas de eletrólitos complexos constituídos por uma mistura de agentes cromóforos (imidazol, acetoamida), inversores de fluxos (FC 135) e micelas (CTAB e TTAB), o que torna o sistema mais passível de variações (diferentes variáveis a serem otimizadas e controladas). Com base nas metodologias descritas na literatura para a determinação de AG por CE, foi possível observar que existe um vasto campo a ser explorado, tanto com relação à utilização de diferentes agentes derivatizantes quanto em relação aos sistemas de eletrólitos mais simples para a detecção indireta.

## 2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e aplicação de um método analítico alternativo para análise de gentamicina e paromomicina, utilizando a eletroforese capilar.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o uso de diferentes derivatizantes: cloreto de dansila (DNS, do inglês *Dansyl chloride*), cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl, do inglês *9-Fluorenylmethoxycarbonyl chloride*), cloreto de 4-metoxibenzenossulfonil (MBSC, do inglês *4-Methoxybenzenesulfonyl chloride*), ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (NQS, do inglês *1,2-Naphtoquinone-4-sulfonic acid*) e isotiocianato de fenilo (PITC, do inglês *Phenyl Isothiocyanate*) na análise quantitativa de PM e GM, utilizando a CE-DAD
- Otimizar e validar um método para análise concomitante de GM e PM, utilizando o derivatizante ortoftaldeído (OPA, do inglês *o-Phthaldialdehyde*) para CE-DAD
- Desenvolver e validar um método indireto de análise de GM e PM, utilizando a CE-DAD
- Obter e caracterizar (quanto à forma geométrica, eficiência na encapsulação e liberação *in vitro* de GM e PM) microesferas de PLGA contendo GM e PM pelo método de dupla emulsão por evaporação de solventes;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras comerciais de fármacos, em SLC simulado e em SLC utilizando as MS de PLGA.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

Os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água para o preparo das soluções foi ultrapurificada pelo sistema *Millipore Milli-Uni-Direct Q® 3UV*. No Quadro 5 estão disponíveis maiores informações sobre esses produtos.

**Quadro 5.** Reagentes utilizados

<i>Reagentes (Eletrólito e tampão)</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Massa molar (g mol<sup>-1</sup>)</i>	<i>Densidade (g mL<sup>-1</sup>)</i>	<i>Pureza (%)</i>	<i>Marca</i>
Fosfato de sódio dibásico heptahidratado	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	268,07	-	≥ 98	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio monobásico monohidratado	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	137,99	-	≥ 98	Sigma-Aldrich
Dodecil sulfato de sódio	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S	288,38	-	≥ 99	Sigma-Aldrich
Poli (vinil álcool)	[-CH <sub>2</sub> CHOH-] <sub>n</sub>	-	-	-	Sigma-Aldrich
poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) 80:20	[C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sub>x</sub> [C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sub>y</sub>	417,83	-	-	Laboratório de biomateriais PUC - Sorocaba
brometo de tetradeciltrimetilamônio	C <sub>17</sub> H <sub>38</sub> BrN	336,39	-	≥ 99	Sigma-Aldrich
brometo de cetiltrimetilamônio	C <sub>19</sub> H <sub>42</sub> BrN	364,45	-	≥ 99	Sigma-Aldrich
Tetraborato de sódio	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	381,37	-	≥ 99	Dinâmica
Acetato de sódio	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Na·3H <sub>2</sub> O	136,08	-	≥ 99	Proquímios
Éter-coroa	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	264,32	-	≥ 99	Sigma-Aldrich
β-ciclodextrina	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub>	1134,98	-	≥ 97	Sigma-Aldrich
Trietilamina	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N	101,19	0,726	≥ 99	Sigma-Aldrich
Bicarbonato de sódio	NaHCO <sub>3</sub>	84,01	-	≥ 99	Vetec
Ureia	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	60,06	-	≥ 99	Sigma-Aldrich
Alginato de Sódio	-	-	-	-	-
Imidazol	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	68,08	-	> 99	Sigma-Aldrich
<i>Derivatizantes</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Massa molar (g mol<sup>-1</sup>)</i>	<i>Densidade (g mL<sup>-1</sup>)</i>	<i>Pureza (%)</i>	<i>Marca</i>
MBSC	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> ClO <sub>3</sub> S	206,65	-	99	Sigma-Aldrich

NQS	$C_{10}H_5NaO_5S$	260,20	-	≥97	Sigma-Aldrich
PITC	$C_7H_5NS$	135,19	1,132	≥99	Sigma-Aldrich
Ninidrina	$C_9H_6O_4$	178,14	-	≥99	Sigma-Aldrich
Fmoc-Cl	$C_{15}H_{11}ClO_7$	258,70	-	≥ 97	Sigma-Aldrich
DNS	$C_{12}H_{12}ClNO_2S$	269,75	-	96	Alfa Aesar
OPA	$C_8H_6O_2$	134,14	-	97	Fluka
<hr/>					
<i>Aminoglicosídeos</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Massa molar (g mol<sup>-1</sup>)</i>	<i>Densidade (g mL<sup>-1</sup>)</i>	<i>Pureza (%)</i>	<i>Marca</i>
Sulfato de Gentamicina	$C_{21}H_{43}N_5O_7$ $H_2SO_4$	575,67	-	≥ 98	Fisher Bioreagents
Sulfato de Paromomicina	$C_{23}H_{45}N_5O_{14}$ $H_2SO_4$	713,71	-	≥ 98	Sigma-Aldrich
<hr/>					
Sulfato de gentamicina e amicacina (amostras comerciais)	-	-	-	-	-
<hr/>					
<i>Bases</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Massa molar (g mol<sup>-1</sup>)</i>	<i>Densidade (g mL<sup>-1</sup>)</i>	<i>Pureza (%)</i>	<i>Marca</i>
Hidróxido de sódio	NaOH	40	-	> 95	Êxodo científica
Hidróxido de potássio	KOH	56,11	-	-	-
<hr/>					
<i>Ácidos</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Massa molar (g mol<sup>-1</sup>)</i>	<i>Densidade (g mL<sup>-1</sup>)</i>	<i>Pureza (%)</i>	<i>Marca</i>
Ác. Clorídrico	HCl	36,46	~1,19	37	Merck
Ác. Fosfórico	$H_3PO_4$	97,99	1,71	85	Merck
Ác. Bórico	$H_3BO_3$	61,83	-	≥ 98	Merck
Ác. α hidroxibutírico	$C_4H_8O_3$	104,10	-	99	Sigma-Aldrich
Ác. Acético	$C_3H_4O_2$	60,05	1,05	100	Merck
Ác. Tioglicólico	$C_2H_4O_2S$	92,11	1,32-1,34	98	Synth
<hr/>					
<i>Solventes*</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Massa molar (g mol<sup>-1</sup>)</i>	<i>Densidade (g mL<sup>-1</sup>)</i>	<i>Pureza (%)</i>	<i>Marca</i>
Acetonitrila	$C_2H_3N$	-	-	99,9	J. T Baker
Diclorometano	$CH_2Cl_2$	84,93	1,33	99,9	Merck
Etanol	$C_2H_6O$	-	-	99,9	Merck
Metanol	$CH_4O$	-	-	99,9	Merck

Legenda: (MBSC) cloreto de 4-metoxibenzenossulfonil, (NQS) ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico, (PITC) isotiocianato de fenilo, (Fmoc – Cl) cloroformiato de 9-fluorenilmetila, (DNS) cloreto de dansila, (OPA) ortoftaldeído. Fonte: elaborado pelo autor.

## 3.2. INSTRUMENTAÇÃO

Para o desenvolvimento e validação do método, bem como para as análises quantitativas dos fármacos, os experimentos deste trabalho foram realizados no equipamento de modelo G7100A da *Agilent Technologies*, equipado com detector de arranjo de Diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detection*) 190-600 nm, sistema para controle de temperatura e um software para integração dos dados.

Os capilares usados são de sílica fundida (*Polymicro Technologies*, Phoenix, AZ, EUA e *Nano Separation Technologies*, SP), com diâmetro interno de 50 e 75  $\mu\text{m}$ . Os capilares novos foram condicionados de acordo com procedimento já bem estabelecido na literatura, que consistiu em lavagem da coluna com uma solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> (600s), seguido de água ultrapura (600 s) e, por último, com o eletrólito de corrida (1200 s). No início de cada dia, o capilar foi condicionado pela passagem por 300 s de solução 1,0 mol L<sup>-1</sup> de NaOH, seguida por 300 s de água ultrapura e 600 s do eletrólito de corrida. Entre cada corrida, o capilar foi condicionado por 180 s min com eletrólito.

## 3.3. MÉTODOS

### 3.3.1. Desenvolvimento do Método para Separação e Quantificação de GM e PM Utilizando a CE-DAD

O desenvolvimento do método de quantificação e separação de GM e PM por CE-DAD, consistiu na avaliação dos seguintes agentes derivatizantes: DNS, FMOC-Cl, MBSC, NQS, PITC e OPA. Também foi avaliado o uso do modo de detecção indireta, utilizando imidazol como eletrólito de corrida.

#### 3.3.1.1. Cloreto de Dansila (DNS)

##### 3.3.1.1.1. Preparo das Soluções e Amostras

A solução estoque do derivatizante (1000,0 mg L<sup>-1</sup>) foi preparada dissolvendo 100,0 mg de DNS em 10,0 mL de acetona. O tampão bicarbonato (0,2% m/v) foi preparado dissolvendo 100,0 mg de bicarbonato de sódio em 50,0 mL de água

ultrapurificada. Em seguida, esse tampão foi misturado em uma proporção de 1:1 com ACN. Os padrões dos aminoglicosídeos ( $2500,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram preparados dissolvendo  $250,0 \text{ mg}$  de cada aminoglicosídeo em  $10,0 \text{ mL}$  de água.

#### 3.3.1.1.2. *Derivatização da PM e GM*

O branco da solução foi preparado misturando  $0,5 \text{ mL}$  de água,  $0,5 \text{ mL}$  do derivatizante e completando um volume para  $5,0 \text{ mL}$  com a mistura de bicarbonato de sódio  $0,2\%$  (m/v) / ACN 1:1. Os padrões foram preparados misturando  $250 \text{ uL}$  de GM ( $2500,0 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $250 \text{ uL}$  de PM ( $2500,0 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $0,5 \text{ mL}$  da solução de DNS ( $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e completando o volume para  $5,0 \text{ mL}$  com a mistura de bicarbonato de sódio  $0,2\%$  (m/v)/ACN 1:1.

#### 3.3.1.1.3. *Condições Analíticas e Instrumentais*

Foram examinados dois modos de separação: MEKC e FSCE. Para o modo de FSCE, dois sistemas com eletrólitos diferentes foram avaliados: eletrólito 01 consistiu de  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão fosfato pH 2,5 e o eletrólito 02 consistiu de  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido fosfórico, ajustado em pH 2,5 com trietilamina (TEA). As seguintes condições instrumentais foram utilizadas: capilar de  $48,5 \text{ cm}$  de comprimento ( $40 \text{ cm}$  efetivo) x  $75 \text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro interno, tensão de  $20 \text{ kV}$  e injeção de  $25 \text{ mbar}$  x  $6\text{s}$ , temperatura de  $29 \text{ }^\circ\text{C}$ , detecção em  $214 \text{ nm}$ .

Para MEKC, foi utilizado um capilar de  $48,5 \text{ cm}$  ( $40 \text{ cm}$  efetivo) x  $75 \text{ }\mu\text{m}$ ; injeção de  $50 \text{ mbar}$  x  $5 \text{ s}$ , detecção em  $214 \text{ nm}$ , temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e tensão de  $20 \text{ kV}$ . Eletrólito consistiu de uma mistura contendo  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de TBS e  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS com variações de  $10\%$  v/v de MeOH ou  $10\%$  v/v de ACN ou  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\beta$ -CD, pH 9,4.

#### 3.3.1.2. 4-metoxibenzenossulfonil (MBSC)

##### 3.3.1.2.1. *Preparo das Soluções e Amostras*

Foram preparadas soluções estoque dos aminoglicosídeos, dissolvendo  $25,0 \text{ mg}$  de cada analito em  $10,0 \text{ mL}$  de água ultrapurificada ( $2500,0 \text{ mg L}^{-1}$ ). As soluções de trabalho foram obtidas pela diluição da solução estoque. O reagente derivatizante foi preparado pela dissolução de  $50,0 \text{ mg}$  de MBSC em  $10,0 \text{ mL}$  de ACN.



O tampão fosfato ( $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10,0) foi preparado pela dissolução de 2,010 g de fosfato de sódio dibásico heptahidratado em 25,0 mL de água ultrapurificada; em seguida, o pH foi ajustado com uma solução de  $6,0 \text{ mol L}^{-1}$  de hidróxido de sódio.

#### 3.3.1.2.2. *Derivatização com GM e PM*

O processo de derivatização constituiu-se em misturar 0,5 mL do padrão de GM ( $680,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), 0,5 mL de PM ( $680,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 0,5 mL de tampão fosfato  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  (a faixa avaliada foi de pH 7-12) com 200  $\mu\text{L}$  de MBSC ( $5000,0 \text{ mg L}^{-1}$ ). O branco da solução e os padrões individuais foram preparados da mesma forma, substituindo os padrões por água ultrapurificada. Essa mistura foi mantida sob o abrigo da luz, com tempos que variaram de 8 - 30 min, sonificação de 0 - 8 min e aquecimento de 0 - 30 min. Essas variações tiveram como objetivo otimizar a reação de derivatização. Além disso, foram testadas duas diferentes concentrações da solução de fosfato ( $0,09 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,18 \text{ mol L}^{-1}$ ).

#### 3.3.1.2.3. *Condições Analíticas e Instrumentais*

Foram testados dois modos de separação, MEKC e FSCE. Para MEKC, foi utilizado capilar de 48,5 cm (40 cm efetivo) x  $75 \mu\text{m}$ ; injeção de 50 mbar x 6s, detecção em 205-206 nm e temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , tensão de 21 kV – 25 kV. Eletrólito de corrida contendo de 15– 25  $\text{mmol L}^{-1}$  de TBS e 30 – 90  $\text{mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 9,4.

Para o modo de FSCE, os eletrólitos testados consistiram de 50  $\text{mmol L}^{-1}$  de tampão fosfato, em pH 2,5, ou 50  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido fosfórico, ajustado em pH 2,5 com TEA, utilizando tensão de 10 kV e injeção de 50 mbar x 4s sendo que as demais condições foram as mesmas que as utilizadas no modo MEKC.

#### 3.3.1.3. Cloreto de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl)

##### 3.3.1.3.1. *Preparo dos Padrões de GM e PM e do Derivatizante*

O tampão borato ( $133,3 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi preparado dissolvendo uma massa de 0,410 g de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) em 50,0 mL de água ultrapurificada e ajustando o pH para 8,0 com KOH  $8,0 \text{ mol L}^{-1}$ . A solução padrão dos aminoglicosídeos foi preparada

transferindo um volume de 0,5 mL de solução padrão (1000,0 mg L<sup>-1</sup>) para um balão volumétrico de 5,0 mL e o volume foi completado com o tampão borato (133,3 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0). O agente derivatizante foi preparado diariamente, dissolvendo 10,0 mg de FMOC-Cl (4 mmol L<sup>-1</sup>) em 10,0 mL de ACN e a solução de glicina foi preparada dissolvendo 75,0 mg de glicina em 10,0 mL de água ultrapurificada.

#### 3.3.1.3.2. *Derivatização com GM e PM*

A derivatização consistiu em misturar 0,5 mL do padrão preparado em solução tampão de borato com 0,5 mL de FMOC-Cl. Em seguida, a solução permaneceu 10 min sob abrigo da luz, antes da adição de 10 µL de 100 mmol L<sup>-1</sup> de glicina.

#### 3.3.1.3.3. *Condições Analíticas e Instrumentais*

Para MEKC, foi utilizado capilar de 48,5 cm (40 cm efetivo) x 75 µm; injeção de 50 mbar x 5 s, detecção em 200 e 260 nm e temperatura de 25 °C, tensão variou de 20 – 21 kV, eletrólito contendo TBS (variando de 15 – 25 mmol L<sup>-1</sup>) e SDS (variando de 50 – 90 mmol L<sup>-1</sup>), pH 9,4.

Para o modo de solução livre (FSCE), os eletrólitos avaliados consistiram de 50 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato em pH 2,5 e 50 mmol L<sup>-1</sup> de ácido fosfórico ajustado em pH 2,5 com TEA, utilizando tensão de 10 kV e injeção de 50 mbar x 4s sendo que as demais condições foram iguais ao modo MEKC.

#### 3.3.1.4. *Ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (NQS)*

##### 3.3.1.4.1. *Preparo das Soluções e Amostras*

A solução estoque de NQS 1% (m/v) foi preparada diariamente, transferindo 100,0 mg do reagente em 10,0 mL de água ultrapurificada. A solução de trabalho de NaOH foi preparada dissolvendo uma massa de 200,0 mg do reagente em 25,0 mL de água ultrapurificada. As soluções estoques da PM e GM foram preparadas dissolvendo 10,0 mg de cada analito em 10,0 mL de água ultrapurificada (1000,0 mg L<sup>-1</sup>).

#### 3.3.1.4.2. *Derivatização com GM e PM*

O branco da solução foi preparado misturando 200  $\mu\text{L}$  de NQS 1% (m/v), 0,6 mL de NaOH 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  e 1,0 mL de água. Para a otimização do método, a mistura padrão de GM e PM foi derivatizada adicionando 200  $\mu\text{L}$  de NQS 1% (m/v), 0,6 mL de NaOH 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$ , 0,5 mL de água e 0,5 mL da mistura de GM e PM (1000,0 mg  $\text{L}^{-1}$ ). Após 10 minutos de repouso, essas soluções foram aquecidas por 10 min a 80 °C e acrescentaram-se mais 3,2 mL de água (vf = 5,0 mL).

#### 3.3.1.4.3. *Condições Analíticas e Instrumentais*

Foi utilizado capilar de 52,5 cm (44,5 cm efetivo) x 75  $\mu\text{m}$ ; injeção de 30 mbar x 5 s, detecção em 239 nm e temperatura de 25-30 °C, a tensão foi avaliada em -19 kV ou de +16 a +22 kV. Eletrólitos de corrida contendo diferentes componentes, tais como tampão acetato, tampão borato, SDS, CTAB,  $\beta$ -CD, Ureia, ACN, MeOH, EtOH e álcool isopropílico foram avaliados.

#### 3.3.1.5. Isotiocianato de Fenilo (PITC)

##### 3.3.1.5.1. *Preparo das Soluções e Amostras*

A solução estoque de PITC (5660,0 mg  $\text{L}^{-1}$ ) foi preparada diariamente, diluindo um volume de 50  $\mu\text{L}$  do reagente concentrado em 10 mL de ACN. A solução de trabalho da TEA (5037,0 mg  $\text{L}^{-1}$ ) foi preparada diluindo um volume de 69  $\mu\text{L}$  do reagente concentrado em 10 mL de ACN. Também foram preparadas soluções estoque de GM e PM, dissolvendo 10,0 mg de cada analito em 10,0 mL de água ultrapurificada (1000,0 mg  $\text{L}^{-1}$ ).

##### 3.3.1.5.2. *Derivatização com GM e PM*

O branco da solução foi preparado misturando 0,5 mL de água, 250  $\mu\text{L}$  da solução de PITC e 250  $\mu\text{L}$  da solução de trietilamina. Para a otimização do método, a mistura padrão foi derivatizada, adicionando 0,5 mL de GM e PM (200,0 mg  $\text{L}^{-1}$ ),

250  $\mu\text{L}$  da solução de trietilamina e 250  $\mu\text{L}$  da solução de PITC. As soluções foram aquecidas a 70°C durante 10 min.

### 3.3.1.5.3. *Condições Analíticas e Instrumentais*

Foram testados os modos de separação MEKC e FSCE. Para o modo de FSCE o eletrólito testado consistiu de 50  $\text{mmol L}^{-1}$  de tampão fosfato em pH 2,6, utilizando as seguintes condições instrumentais: capilar de 48,5 cm de comprimento (40 cm efetivo) x 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, tensão de 15 kV e injeção de 30 mbar x 7s, temperatura de 27 °C, detecção em 240 nm.

Para MEKC, foram utilizados capilares de 40,0 e 50,8 cm de comprimento total, com diâmetro interno de 50 e 75  $\mu\text{m}$ ; injeção de 50 mbar x 5-8 s, detecção em 240 nm, temperatura avaliada no intervalo de 25 - 30 °C e tensão de -24 ou de +8 até +20 kV. Diferentes eletrólitos foram testados utilizando CTAB e SDS.

### 3.3.1.6. Ortoftaldeído (OPA)

#### 3.3.1.6.1. *Preparo das Soluções e Amostras*

O tampão borato (30  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 11,0) foi preparado dissolvendo 93,0 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  em 50,0 mL de água e ajustando o pH com KOH 8,0  $\text{mol L}^{-1}$ .

Para o preparo da solução derivatizante, foi transferido 0,60 g de OPA para um frasco volumétrico contendo 2,0 mL de MeOH; após a completa dissolução, foram adicionados 15,0 mL do tampão borato (30  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 11,0) e 0,5 mL de ácido tioglicólico. Em seguida, o pH foi novamente ajustado para 11,0 com KOH 8,0  $\text{mol L}^{-1}$  e essa solução foi ajustada para um volume final de 20,0 mL com tampão borato (30  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 11,0).

Esse método foi aplicado tanto em amostras comerciais de GM quanto em uma simulação de um SLC feita de GM e PM, utilizando membrana de diálise em meio aquoso.

As soluções estoque das amostras comerciais foram preparadas diluindo volumes apropriados em 10,0 mL de água, exceto para a pomada de suspensão otológica, para a qual foi utilizado um processo de extração que consistiu em adicionar

1,5710 g do produto em 5,0 mL de água, agitar em vortex por 2 min, acrescentar nessa mistura 5,0 mL de DCM e agitar por mais 2 min. Por último, essa mistura foi centrifugada por 5 min a 2100 rpm e 5,0 mL do sobrenadante foram retirados e o volume final acertado para 10,0 mL com água.

Um perfil de liberação controle (simulação de um SLC) de PM e GM também foi realizado. Foram inseridos 3,0 mL de uma mistura padrão de PM e GM com concentração de  $250,0 \text{ mg L}^{-1}$  dentro de uma membrana de diálise (12000 – 16000 Da) com cerca de 4 cm x 3,2 cm. Em seguida, essa membrana foi introduzida em um béquer contendo 8,0 mL de água e esse sistema ficou em banho maria, a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante todo o período do experimento. Em intervalos de tempo predeterminados (5 min, 10 min, 15 min, 25 min, 40 min, 55 min, 75 min, 95 min, 115 min, 175 min, 235 min, 295 min, 355 min e 415 min), 0,5 mL da solução foi retirado e substituído por 0,5 mL de água. As amostras foram analisadas por CE-DAD.

#### 3.3.1.6.2. *Derivatização com GM e PM*

O branco da solução foi preparado misturando 0,5 mL de MeOH, 0,5 mL de água e 30  $\mu\text{L}$  da solução de OPA. Para a otimização do método, a mistura padrão foi derivatizada, adicionando 83  $\mu\text{L}$  de GM ( $2500,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), 83  $\mu\text{L}$  de PM ( $2500,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), 334  $\mu\text{L}$  de água, 0,5 mL de MeOH e 30  $\mu\text{L}$  do derivatizante. Essa solução foi aquecida por 5 min, a  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , antes de ser analisada.

As amostras farmacêuticas foram preparadas misturando 155  $\mu\text{L}$  da amostra ( $500,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), 345  $\mu\text{L}$  de água, 0,5 mL de MeOH e 30  $\mu\text{L}$  do derivatizante. Essa solução foi aquecida por 5 min a  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , resfriada à temperatura ambiente e analisada.

Para a derivatização das amostras da curva de liberação simulada, misturaram-se 500  $\mu\text{L}$  da amostra, 0,5 mL de MeOH e 30  $\mu\text{L}$  do derivatizante. Essa solução também foi aquecida, por 5 min a  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , resfriada à temperatura ambiente e analisada.

#### 3.3.1.6.3. *Condições Analíticas e Instrumentais*

A separação otimizada foi realizada em capilar de sílica de 40 cm total (31,5 cm de comprimento efetivo) x 75  $\mu\text{m}$  e os testes foram feitos com eletrólito de corrida

contendo TBS (variando de 30-50 mmol L<sup>-1</sup>), β-ciclodextrina (variando de 0 - 7,5 mmol L<sup>-1</sup>) e MeOH (variando de 12,5 – 16,5 % v/v) ou ACN (variando de 5,0 - 15,5 % v/v), pH 9,4. Injeção: 50 mbar x 5 s. A tensão aplicada variou de 14,5 - 15,2 kV a temperatura variou de 21-25 °C e a detecção foi testada em diferentes comprimentos de onda (230, 330 e 350 nm).

### 3.3.1.7. Detecção Indireta

#### 3.3.1.7.1. *Preparo dos Padrões e Aplicação do Método*

Foram preparadas soluções estoque de GM, PM e AM, dissolvendo 25,0 mg de cada analito em 10,0 mL de água ultrapurificada (2500,0 mg L<sup>-1</sup>). As soluções de trabalho foram obtidas pela diluição da solução estoque.

Esse método foi aplicado tanto em amostras comerciais de GM quanto em uma simulação de um SLC feita com GM e PM, utilizando membrana de diálise em meio aquoso.

As soluções estoque das amostras comerciais foram preparadas diluindo volumes apropriados em 10,0 mL de água, exceto para a pomada de suspensão otológica, para qual foi utilizado um processo de extração que consistiu em adicionar 1,5710 g do produto em 5,0 mL de água, agitar em vortex por 2 min, acrescentar nessa mistura 5,0 mL de DCM e agitar por mais 2 min. Por último, essa mistura foi centrifugada por 5 min a 2100 rpm e 5,0 mL do sobrenadante foram retirados e avolumados para 10,0 mL com água.

O perfil de liberação controle (simulação de um SLC) de PM e GM foi avaliado, inserindo 3,0 mL de uma mistura padrão de PM e GM com concentração de 500,0 mg L<sup>-1</sup> dentro de uma membrana de diálise (12000 – 16000 Da) com cerca de 4 cm x 3,2 cm. Em seguida, essa membrana foi introduzida em um béquer contendo 8,0 mL de água e esse sistema ficou em banho maria a 37 °C durante todo o período do experimento. Em tempos predeterminados (5 min, 10 min, 15 min, 25 min, 40 min, 55 min, 75 min, 95 min, 115 min, 175 min, 235 min, 295 min, 355 min e 415 min), um volume de 0,5 mL da solução foi retirado e substituído por 0,5 mL de água. As amostras foram analisadas por CE-DAD.



### 3.3.1.7.2. Condições analíticas e instrumentais

A separação foi conduzida em capilar de sílica de 58,5 cm total (50 cm de comprimento efetivo) x 75  $\mu\text{m}$ , a otimização do método consistiu em avaliar diferentes condições analíticas como o eletrólito de corrida constituído por imidazol (a concentração variou de 30 - 50  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e o valor de pH no intervalo de 2,5 - 6,5. Já as condições instrumentais estudadas foram: tempo de injeção em 30 mbar variando de 4 - 10 s. A tensão aplicada foi avaliada no intervalo de 9 - 13 kV, a temperatura no intervalo de 27 - 31  $^{\circ}\text{C}$  e a detecção foi feita no modo indireto em 214 nm (referência: 400 nm, sinal: 214 nm).

O eletrólito otimizado foi preparado diariamente, transferindo um volume de 7,5 mL da solução de 100  $\text{mmol L}^{-1}$  de imidazol para um balão volumétrico de 25,0 mL e ajustado o pH em 2,5 com HCl 1,0  $\text{mol L}^{-1}$  antes de completar o volume com água ultrapurificada.

### 3.3.1.8. Método Espectrofotométrico Utilizando Ninidrina

#### 3.3.1.8.1. Preparo das Soluções e Amostras

O método colorimétrico utilizado foi descrito por Frutos et al. (2000). Foi pesado 0,3120 g de ninidrina e dissolvido em 25,0 mL de tampão fosfato, pH 7.4. O tampão fosfato foi preparado pela adição de 50,0 mL de 0,2  $\text{mol L}^{-1}$  de fosfato de sódio monobásico e 39,1 mL de 0,2  $\text{mol L}^{-1}$  de NaOH, diluídos para 200,0 mL com água. As soluções de trabalho de GM e PM foram diluídas em tampão.

As soluções estoque das amostras comerciais foram preparadas diluindo volumes apropriados em 10,0 mL de água, exceto para a pomada de suspensão otológica, para a qual foi utilizado um processo de extração que consistiu em adicionar 1,5710 g do produto em 5,0 mL de água, agitar em vortex por 2 min, acrescentar nessa mistura 5,0 mL de DCM e agitar novamente por mais 2 min. Por último, essa mistura foi centrifugada por 5 min a 2100 rpm e 5,0 mL do sobrenadante foram retirados e avolumados para 10,0 mL com água.



### 3.3.1.8.2. Derivatização com GM e PM

O processo de derivatização consistiu em transferir para um balão volumétrico de 5,0 mL um volume apropriado da solução estoque de GM, PM e completar o volume com solução tampão de fosfato. Um volume de 0,5 mL de cada amostra farmacêutica foi transferido para um balão volumétrico de 5,0 mL e o volume foi completado com solução tampão de fosfato. A mistura padrão de PM e GM foi transferida para um tubo de vidro e foi adicionado um volume de 1,5 mL de 1,25 % (m/v) de ninidrina. Essa mistura foi aquecida por 15 min a 95 °C, em banho maria, e esfriada em temperatura ambiente antes de ser analisada por espectrofotometria em 400 nm. O mesmo procedimento foi feito para as amostras.

## 3.3.2. Obtenção e Caracterização das Microesferas de PLGA

### 3.3.2.1. Obtenção das Microesferas

O melhor resultado obtido para a obtenção de microesferas de PLGA foi o de dupla emulsão por evaporação de solvente adaptado de Moura e colaboradores (2015). 16,0 mg de PM e 4,0 mg de GM foram dissolvidos em 300 µL de tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*), pH 7,4. Depois disso, essa solução foi adicionada em 4,0 mL de DCM contendo 100,0 mg de PLGA 80 : 20 (massa molar = 417,83 g/mol) e emulsificada por 4 min a 17500 rpm no mixer Ultra Turrex (T25, IKA) (emulsão  $w_1/o$ ). Essa emulsão foi vertida em outra mistura, contendo 12,0 mL de PVA 2% (m/v) e 24,0 mL de NaCl 4 % (m/v) e homogeneizada no mixer por mais 6 min a 17500 rpm para gerar a emulsão 2 ( $w_1/o/w_2$ ). A amostra obtida foi agitada, em agitador magnético, por 5 horas para a evaporação do solvente, centrifugada por 10 min a 5000 rpm e lavada duas vezes com água deionizada. O sobrenadante foi, então, armazenado para verificação da eficiência de encapsulação (item 3.3.2.3). Por último, as amostras permaneceram 24 h no freezer e foram, então, liofilizadas por mais 24h.

### 3.3.2.2. Microscopia

Utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Hitachi TM3000, tensão de operação 15kV - automático) localizado no laboratório FINEP 2 (ATLAB 119), UFSCar - *campus* Sorocaba, para observar a morfologia das micropartículas obtidas por diferentes métodos. Aproximadamente 2,0 mg das micropartículas foram distribuídos homogeneamente na fita de carbono adesivada no porta-amostra para a captura das imagens.

### 3.3.2.3. Eficiência

Para verificar a eficiência de encapsulação da PM e GM nas microesferas de PLGA utilizou-se o método utilizado por Correia e colaboradores (2014). O sobrenadante resultante do processo de obtenção das microesferas foi analisado por CE-DAD e empregou-se a seguinte fórmula:

$$EE(\%) = \frac{AG \text{ adicionados} - AG \text{ presentes no sobrenadante}}{AG \text{ adicionados}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.3.2.4. Perfil de Liberação

O teste do perfil de liberação para as microesferas foi adaptado de Chaisri e colaboradores (2011). Para cada replicata, 10,0 mg das microesferas liofilizadas foram transferidos para um tubo de *ependorf* e suspensos em 1,0 mL de PBS. Em seguida, as amostras foram mantidas no banho seco (DBHS, Loccus), em contínua agitação (300 rpm) a 37 °C por 6 dias. Em tempos predeterminados (0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 24 h, 33 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h), as amostras foram centrifugadas (10000 rpm por 2 min) e 0,5 mL do sobrenadante foi retirado e substituído por 0,5 mL de tampão. Em seguida, as amostras foram agitadas cinco vezes manualmente e levadas ao ultrassom por 30 s. O sobrenadante retirado foi analisado por CE-DAD, utilizando o método de derivatização com o OPA e pelo método espectrofotométrico, utilizando a ninidrina.

### 3.3.2.5. Análise da curva de liberação para as microesferas

Para o método do OPA, a derivatização das amostras (perfil de liberação e eficiência) foi feita misturando um volume de 500  $\mu\text{L}$  da amostra, 0,5 mL de MeOH e 30  $\mu\text{L}$  do derivatizante. Essa solução foi aquecida por 5 min a 40 °C, resfriada a temperatura ambiente e analisada por CE-DAD.

Para o método da ninidrina, uma solução estoque de AG total foi preparada na concentração de 1000,0  $\text{mg L}^{-1}$  (800,0  $\text{mg L}^{-1}$  de PM e 200,0  $\text{mg L}^{-1}$  de GM). Por diluição, a solução de trabalho com concentração de 300,0  $\text{mg L}^{-1}$  de AG totais foi preparada e utilizada para a construção da curva analítica, com concentrações de 5,0  $\text{mg L}^{-1}$ , 30,0  $\text{mg L}^{-1}$ , 60,0  $\text{mg L}^{-1}$ , 90,0  $\text{mg L}^{-1}$  e 166,0  $\text{mg L}^{-1}$ .

O método da ninidrina foi adaptado, ajustando as análises para um volume final de 3,0 mL. A solução de ninidrina foi preparada dissolvendo uma massa de 0,350 g de ninidrina em 100,0 mL de solução tampão de fosfato. A derivatização foi feita misturando um volume de 500  $\mu\text{L}$  da amostra com 2,5 mL da ninidrina. A mistura foi aquecida por 15 min, a 95 °C em banho maria, e esfriada em temperatura ambiente, antes de ser analisada por espectrofotometria em 400 nm.

### **3.3.3. Validação do Método para Separação e Quantificação de GM e PM Utilizando CE-DAD**

O método de detecção indireta foi validado de acordo com as recomendações presentes no guia da ICH (*International Conference on Harmonisation*) (ICH, 2005)

#### 3.3.3.1. Seletividade

A seletividade tem como objetivo identificar o analito, de maneira distinta, considerando a possível existência de outros compostos presentes na matriz. Para verificar a seletividade, foi utilizado o método de adição padrão em amostras comerciais de GM e PM e, então, comparando com os eletroferogramas do padrão dos aminoglicosídeos em água (ICH, 2005).

### 3.3.3.2. Linearidade e intervalo de análise

A linearidade de um método pode ser definida pela capacidade em obter resultados diretamente proporcionais às concentrações dos analitos (dentro de um intervalo determinado). Para a determinação da linearidade, foi construída uma curva analítica com cinco diferentes concentrações e analisadas em triplicatas (RIBANI et al., 2004). A linearidade foi calculada por regressão linear, obtendo-se os resultados do coeficiente angular (*slope*), intersecção da curva (*intercept*) e coeficiente de correlação (*r*).

### 3.3.3.3. Precisão

A precisão é definida como a concordância da proximidade entre os valores obtidos entre análises feitas repetidamente nas mesmas condições. A precisão foi avaliada em relação à repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade expressa a precisão realizada sob as mesmas condições operacionais em um curto período de análise. Neste trabalho, a repetibilidade foi avaliada em três diferentes níveis de concentração (baixa, média e alta), sendo cada concentração analisada em triplicata (ICH, 2005). A precisão intermediária expressa as variações que ocorrem em diferentes dias, com diferentes analistas ou em diferentes equipamentos. Neste trabalho, a precisão intermediária foi determinada em três diferentes níveis de concentração (baixa, média e alta), em diferentes dias (três dias consecutivos, pelo mesmo analista e mesmo equipamento) sendo que cada concentração foi analisada em triplicata (ICH, 2005).

Os resultados da precisão foram expressos em desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

### 3.3.3.4. Exatidão

A exatidão é definida pela proximidade entre os resultados obtidos pelo método desenvolvido em relação ao valor real (o valor do resultado da análise e o valor de referência). A exatidão do método proposto foi avaliada na forma de recuperação,

sendo adicionadas concentrações conhecidas dos analitos em amostras farmacêuticas. A porcentagem de recuperação foi calculada de acordo com a equação 2 (ICH, 2005).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{A_{af} - A_{asf}}{A_{sp}} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

$A_{af}$  = área da amostra fortificada;  $A_{asf}$  = área da amostra sem fortificação;  $A_{sp}$  = área da solução padrão.

#### 3.3.3.5. Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O LOD é definido como o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado e o LOQ é o menor valor de concentração do analito que pode ser quantificado com os maiores valores de precisão e exatidão obtidos no método. Os LOD e LOQ foram determinados considerando o sinal-ruído (S/N) na razão de 3:1 e 10:1, respectivamente (ICH, 2005).

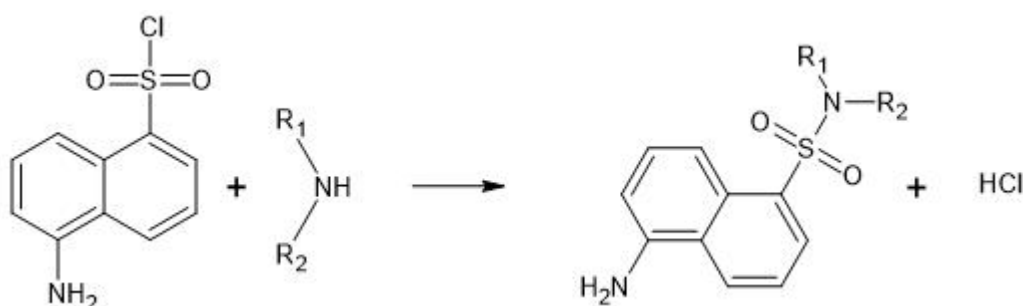
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 4.1.1. Cloreto de Dansila (DNS)

As aminas primárias e/ou secundárias reagem com DNS para formar adutos que podem ser detectados tanto na região do UV como por fluorescência (Figura 17).

Figura 17. Reação de derivatização entre DNS e aminas



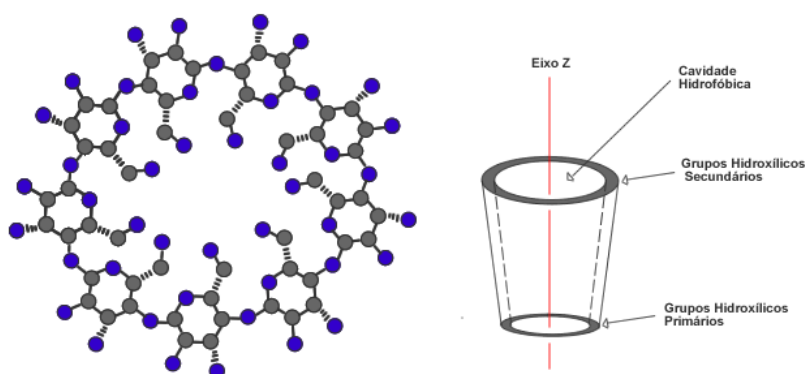
Fonte:Adpatado de WADE, (2013)

O procedimento de derivatização de aminoglicosídeos com DNS já havia sido proposto no trabalho de Buchanan e colaboradores (1982), no qual os autores misturam uma solução de DNS  $3,7 \text{ mmol L}^{-1}$  dissolvida em acetona com uma solução de PM em bicarbonato de sódio 0,2% (m/v), pH 7,5. Após esse procedimento, essa mistura foi aquecida por 18 horas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e analisada por espectrofotometria. Sampath e Robinson (1989) investigaram as melhores condições da reação entre DNS e TM, utilizando a espectrofotometria. As condições otimizadas foram: pH da solução em 9,5; um excesso de 25 vezes do derivatizante, tempo de reação de 2 horas e temperatura de  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ .

O procedimento de derivatização realizado neste trabalho foi baseado no artigo de Buchanan e colaboradores (1982) e, inicialmente, foi testada a separação por MEKC devido à incerteza da carga dos adutos formados. Nesse modo, é comum a utilização de modificadores orgânicos e aditivos no eletrólito de corrida, a fim de aumentar a solubilidade de compostos hidrofóbicos, alterar o fator de capacidade (definido pela razão entre os analitos incorporados dentro e fora da micela) e alterar a seletividade dos analitos (ALTRIA, 1996; QI et al., 2017). Diversos solventes orgânicos

já foram utilizados com essa finalidade, entre eles ACN, MeOH e etanol (EtOH). O aditivo mais comumente utilizado é a ciclodextrina. Ciclodextrinas, assim como proteínas, éter-coroa, surfactantes, entre outros compostos, são frequentemente utilizados no eletrólito de corrida como seletores quirais em CE. As ciclodextrinas são oligossacarídeos formados por unidades de glucopiranosose, sendo as mais utilizadas a  $\alpha$ -CD composta por seis unidades, a  $\beta$ -CD por sete unidades e a  $\gamma$ -CD por oito unidades. Possuem formato de cone truncado, com cavidade hidrofóbica e superfície hidrofílica (BAKER, 1995) (Figura 18). No entanto, a versatilidade das ciclodextrinas em separar diferentes compostos está relacionada com o diâmetro de sua cavidade e dos grupos substituintes presentes (BAKER, 1995; SAZ; MARINA, 2016).

**Figura 18.** Esquema da estrutura das ciclodextrinas



Fonte: adaptado de ZHIYUAN BIOTECHNOLOGY, (2018)

Com base nisso, foram testados eletrólitos constituídos de 20 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, MeOH, ACN ou  $\beta$ -CD. Para a separação em FSCE foi avaliado um sistema de eletrólito em meio ácido (pH 2,5), com o objetivo de tornar os adutos carregados positivamente.

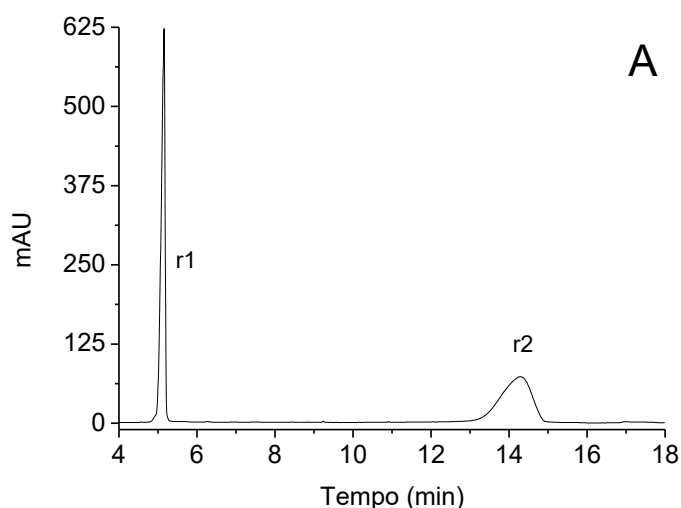
Os testes feitos neste trabalho utilizando DNS estão sumarizados no Quadro 6. O objetivo inicial foi avaliar se a derivatização ocorria e então otimizar a separação entre DNS-GM e DNS-PM.

**Quadro 6.** Condições analíticas avaliadas para o DNS

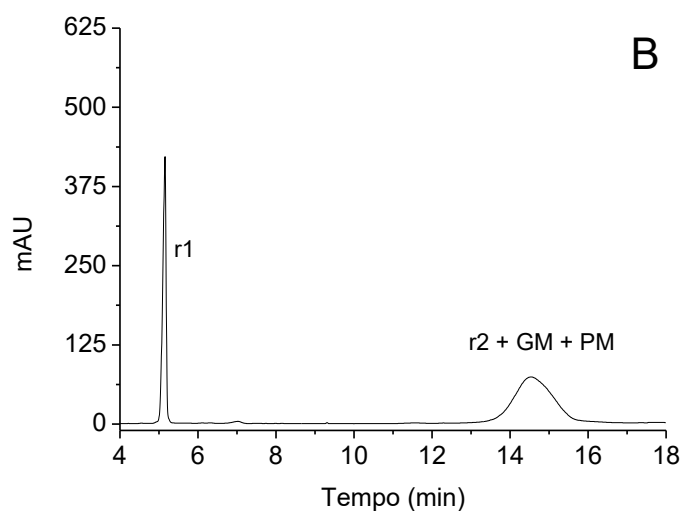
<i>Variável</i>	<i>Figura</i>
<b><u>MEKC</u></b>	-
20 mmol L <sup>-1</sup> de TBS contendo 50 mmol L <sup>-1</sup> de SDS	-
20 mmol L <sup>-1</sup> de TBS contendo 50 mmol L <sup>-1</sup> de SDS e 10% MeOH	-
20 mmol L <sup>-1</sup> de TBS contendo 50 mmol L <sup>-1</sup> de SDS e 10% ACN	Figura 19
20 mmol L <sup>-1</sup> de TBS contendo 50 mmol L <sup>-1</sup> de SDS e 15 mmol L <sup>-1</sup> de β-ciclodextrina	-
<b><u>FSCE</u></b>	-
50 mmol L <sup>-1</sup> de ác. Fosf. Ajustado com TEA	Figura 20

Fonte: Elaborado pelo autor.

Entre os eletrólitos avaliados para a MEKC, o que apresentou resultados mais promissores foi o sistema constituído de 20 mmol L<sup>-1</sup> de TBS, 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 10% ACN, pH 9,4 (Figura 19). Foi possível verificar a presença de picos nos eletroferogramas, mas com coeluição entre os analitos de interesse e o reagente. Mesmo variando alguns parâmetros instrumentais, como temperatura e tensão (resultados não mostrados), os resultados obtidos não foram satisfatórios, uma vez que nenhuma das condições testadas foi capaz de separar os componentes da GM/PM do reagente.

**Figura 19.** Avaliação do modo MEKC na separação de DNS-GM e DNS-PM

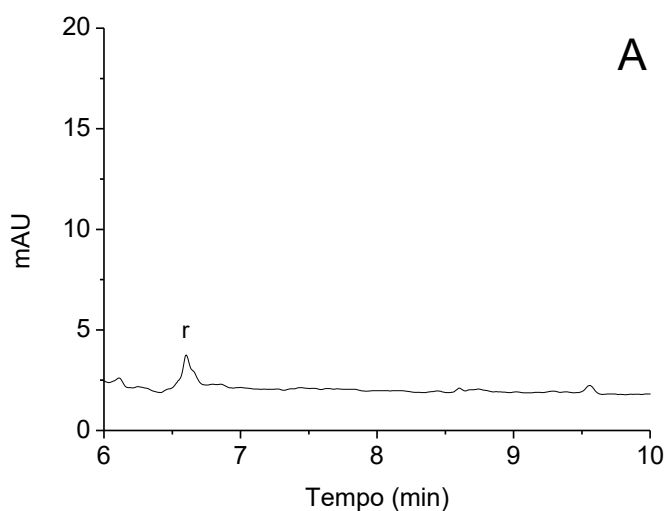


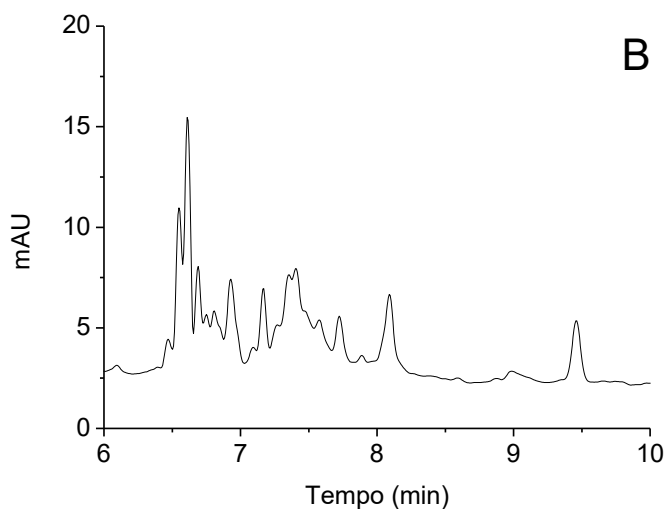


Legenda: eletroferograma (A) do branco da solução (B) da mistura  $125,0 \text{ mg L}^{-1}$  de sulfato de GM e PM. Condições: Eletrólito:  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de TBS contendo  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS e 10% ACN, pH 9,4. Temperatura:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tensão: 20 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de  $75 \text{ }\mu\text{m}$  d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo). Detecção: 214 nm. Identificação dos picos: (r1, r2) reagente, (GM) Gentamicina, (PM) Paromomicina. Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 20 apresenta os eletroferogramas no modo de separação em FSCE. O eletrólito foi constituído de  $140 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido fosfórico e pH 2,5 ajustado com TEA. As condições analíticas e instrumentais utilizadas foram baseadas no sistema de separação desenvolvido no grupo de pesquisa para a determinação de aminas biogênicas em alimentos (MANTOANELLI, 2019).

**Figura 20.** Avaliação do modo FSCE utilizando DNS





Legenda: eletroferograma (A) do branco da solução (B) da mistura 125,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM e PM. Condições: Eletrólito: 140 mmol L<sup>-1</sup> de ác fosfórico, pH 2,5 (ajustado com TEA). Temperatura: 29 °C. Tensão: 20 kV. Injeção: 25 mbar x 6 s. Capilar de 75 µm d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo). Detecção: 214 nm. Identificação dos picos: (r1) reagente Fonte: elaborado pelo autor

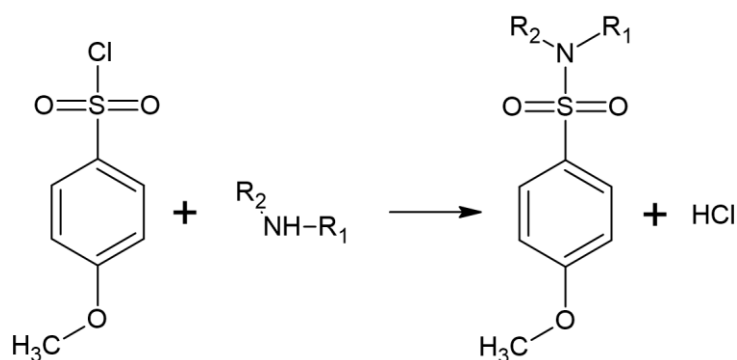
Diferentemente dos testes utilizando MEKC, o branco da solução (FSCE) apresentou apenas um pico, com tempo de migração entre 6,5 e 7 min (Figura 20 A). Para a mistura padrão contendo os aminoglicosídeos (125,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM/PM), foi possível observar a presença de vários picos. Apesar de o sistema de separação apresentar picos referentes aos AG, alguns fatores foram relevantes para a não continuidade dos testes com DNS: i) não foi possível identificar os componentes dos AG, devido à coeluição entre os analitos; ii) baixa magnitude do sinal analítico para valores elevados de concentração; iii) processo de derivatização dispendioso (17 h de reação com temperatura controlada). Cabe mencionar que o procedimento de derivatização poderia ser otimizado, uma vez que o tempo de reação pode ser reduzido com o aumento da temperatura e ajuste de pH, entretanto, a baixa magnitude do sinal analítico foi determinante para a decisão de não continuar avaliando esse sistema de separação.

#### 4.1.2. 4-cloreto de metoxibenzenosulfonila (MBSC)

A escolha do MBSC como reagente de derivatização e o procedimento foram baseados na literatura (LARSEN; MARINELLI; HEILESEN, 1980; SUN et al., 2010). Larsen e colaboradores (1980) empregaram o cloreto de benzenosulfonila, um composto com estrutura semelhante ao MBSC, para análise de GM por HPLC. No trabalho de Sun e colaboradores (2010), o fluoreto de metoxibenzenossulfonila foi utilizado como agente derivatizante para a determinação de ácido aminometilfosfônico (AMPA) e glifosato em amostras de água.

O MBSC pode reagir tanto com aminas primárias como aminas secundárias (Figura 21).

**Figura 21.** Reação de derivatização entre MBSC e amina



Adaptado de: WADE, (2013)

Devido à ausência de informações específicas na literatura a respeito da reação de derivatização entre MBSC e os AG, diferentes condições como concentração do tampão, tempo de reação, temperatura de reação e pH reacional foram avaliadas. Também foram investigados diferentes parâmetros analíticos e instrumentais com o objetivo de avaliar o sistema de separação. O Quadro 7 apresenta as diferentes condições avaliadas nesse estudo.

**Quadro 7.** Condições analíticas avaliadas para o MBSC

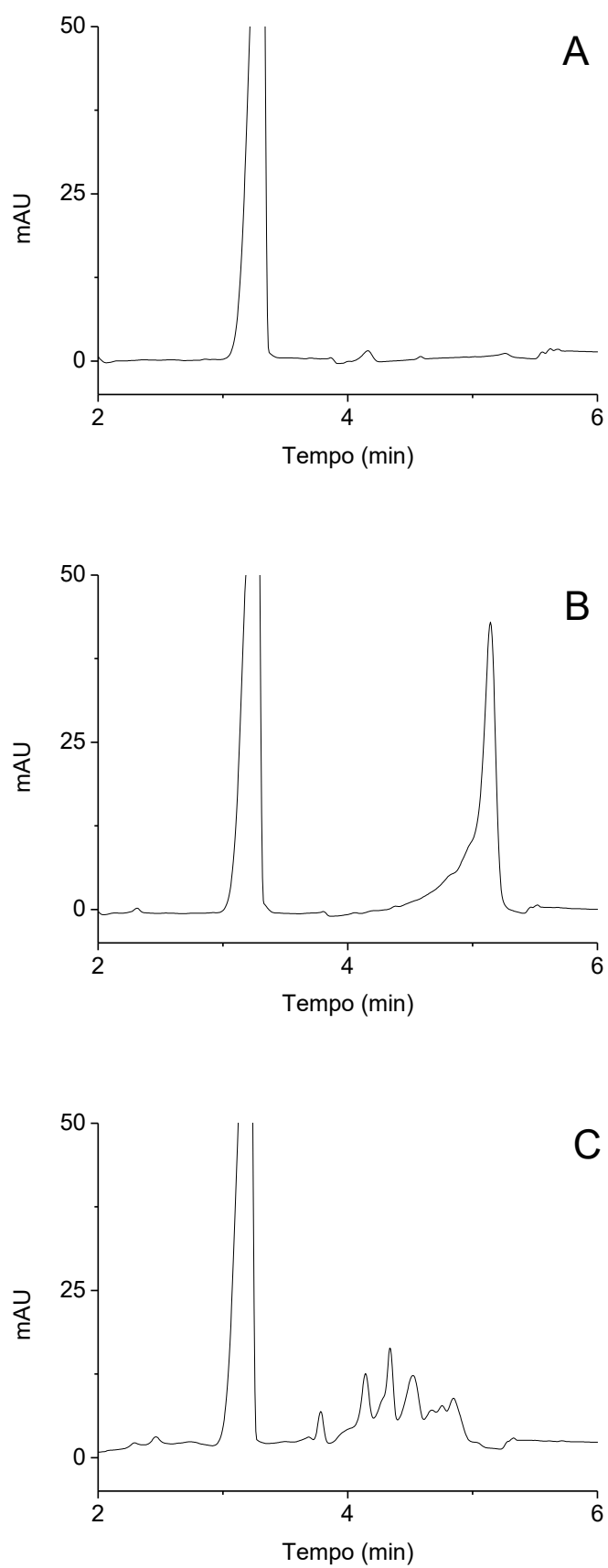
<i>Variável</i>	<i>Faixa do teste</i>	<i>Condição otimizada</i>	<i>Figura</i>
<b>Reação de derivatização</b>			
pH da solução	7-12	10	Figura 23
Tempo de reação (min)	8 - 30	8	-
[Fosfato] (mmol L <sup>-1</sup> )	90 -180	90	-
Sonicação 8 min	-	-	-
Aquecimento (30 min à 40 °C)	-	-	-
Melhores condições	-	-	Figura 22
<b>Condições analíticas e instrumentais para separação</b>			
<b><u>MEKC</u></b>			
[SDS] no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	30-90	-	Figura 24
[TBS] no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	15-25	-	-
β-ciclodextrina no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	15	-	-
ACN (%)	10	-	Figura 25 A
MeOH (%)	10	-	Figura 25 B
<b><u>FSCE</u></b>			
50 mmol L <sup>-1</sup> de fosfato pH 2,5	-	-	-
50 mmol L <sup>-1</sup> de ác. Fosf. Ajustado com TEA	-	-	Figura 26

Fonte: Elaborado pelo autor

Os parâmetros avaliados para a otimização do procedimento de derivatização incluíram: a variação do pH na faixa de 7,0 - 12,0, concentração (90 e 180 mmol L<sup>-1</sup>) para a solução tampão de fosfato, tempo de reação de 8 e 30 min sob abrigo da luz, efeito do ultrassom (8 min) e aquecimento (40 °C por 30 min). As melhores condições foram obtidas com 90 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato pH 10,0 e 8 min de tempo de reação sob abrigo da luz. Essa escolha foi baseada na magnitude do sinal analítico, forma do pico e tempo de migração dos compostos.

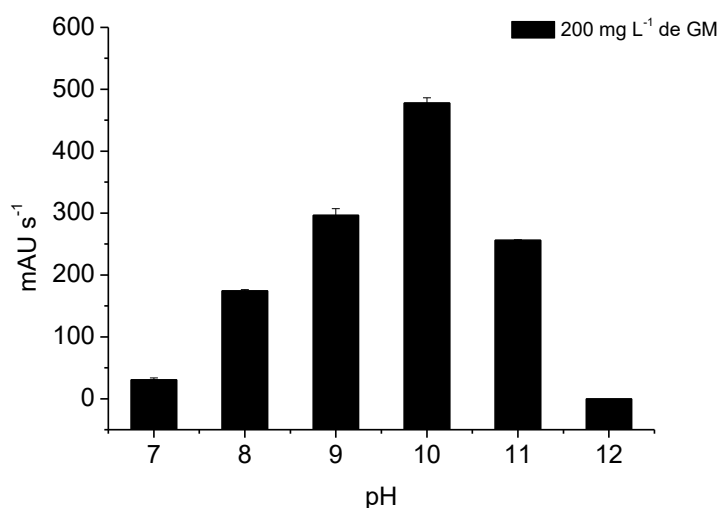
Os eletroferogramas das condições otimizadas da reação de derivatização do branco da solução, padrão da GM bem como o padrão da PM são mostrados na Figura 22. Na Figura 23, os valores de área para PM não foram apresentados, devido à estrutura não uniforme de seu pico, entretanto, notou-se que esse valor de pH também foi o melhor resultado obtido para PM, devido à magnitude do sinal analítico (resultados não mostrados).

**Figura 22.** Branco da solução e padrões individuais de 200,0 mg L<sup>-1</sup> da GM e PM nas melhores condições de derivatização



Legenda: eletroferograma do (A) branco da solução (B) padrão 200,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM e (C) padrão 200,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de PM em água. Condições: Eletrólito: 15 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 9,4. Temperatura: 25 °C. Tensão: 25 kV. Injeção: 50 mbar x 6 s. Capilar de 75 µm d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo). Detecção: 206 nm. Fonte: elaborado pelo autor

**Figura 23.** Efeito da variação de pH na magnitude do sinal analítico (área) da GM



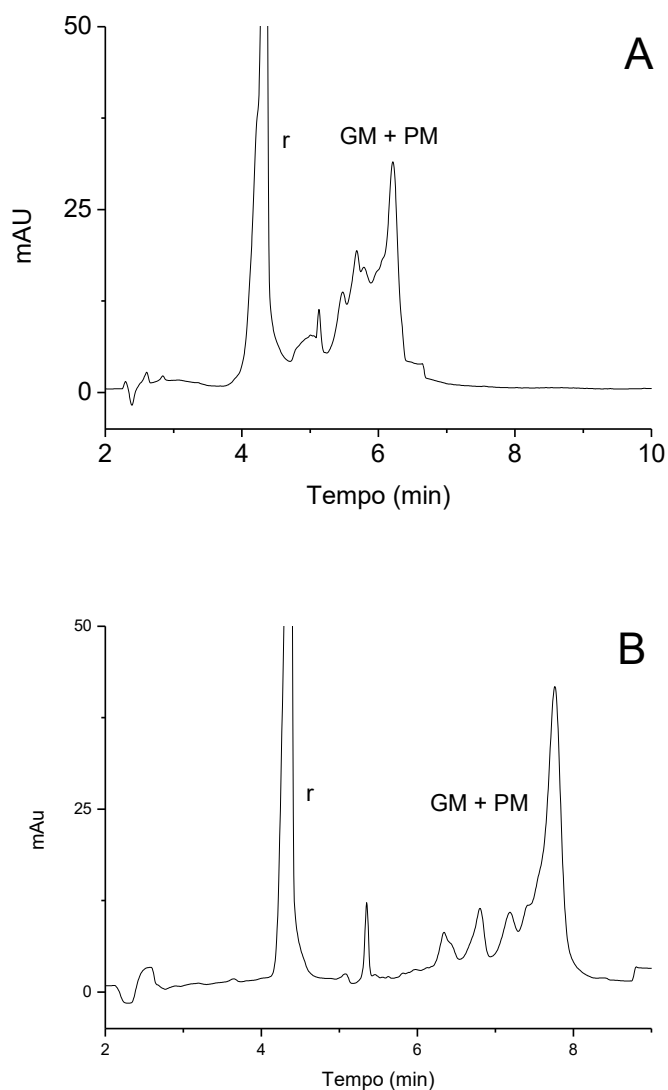
Fonte: Elaborado pelo autor

Após a otimização das condições de derivatização, foram testadas diferentes composições e concentrações do eletrólito de corrida, utilizando os modos MEKC e FSCE, com o objetivo de otimizar o sistema de separação.

Em MEKC, diferentes tensoativos podem ser empregados para formar micelas, os quais podem ser catiônicos, aniônicos, zwitteriônicos e não-iônicos. Cada um possui uma concentração acima da qual ocorre a formação de micelas, chamada de concentração crítica micelar. O tensoativo mais comumente utilizado é o SDS, um composto aniônico, com concentração crítica micelar de 8 mmol L<sup>-1</sup> (WU et al., 2014). O intervalo de concentração de SDS utilizado em sistemas de separação em CE normalmente varia de 50 - 150 mmol L<sup>-1</sup>, pois o aumento da concentração do tensoativo é diretamente proporcional ao fator de capacidade e isso pode alterar a separação dos compostos (BAKER, 1995). Por esse motivo, é necessário verificar o efeito da concentração de SDS no sistema de separação, definindo seu valor ótimo. Ao variar a concentração de SDS de 30 a 90 mmol L<sup>-1</sup> no eletrólito (Figura 24), observou-se um aumento no tempo de migração dos analitos, devido à solubilização dos adutos na fase micelar. Além disso, houve uma discreta melhora na resolução dos componentes presentes na mistura padrão, porém, o valor da corrente também

aumentou, o que inviabilizou a utilização de concentrações acima de 90 mmol L<sup>-1</sup> de SDS. O efeito da concentração de SDS no intervalo de 40 - 80 mmol L<sup>-1</sup> não foi apresentado, uma vez que não foram observadas variações significativas no sistema de separação.

**Figura 24.** Efeito da concentração de SDS no sistema de separação



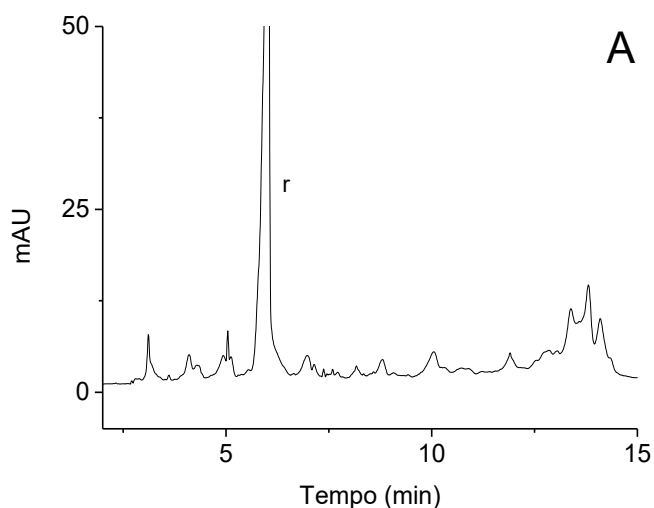
Legenda: eletroferograma da mistura de sulfato de GM e PM 200,0 mg L<sup>-1</sup> em água. Condições: Eletrólito: 15 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo, (A) 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS (B) 90 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 9,4. Temperatura: 25 °C. Tensão: 25 kV. Injeção: 50 mbar x 6 s. Capilar de 75 µm d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo). Detecção: 206 nm. Identificação dos picos: (r) reagente Fonte: elaborado pelo autor.

A variação da concentração de TBS no eletrólito pode alterar a mobilidade dos compostos, pois causa alteração no potencial zeta, e conseqüentemente no EOF (WEINBERGER, 2000) e, por essa razão, o efeito da concentração de TBS no sistema

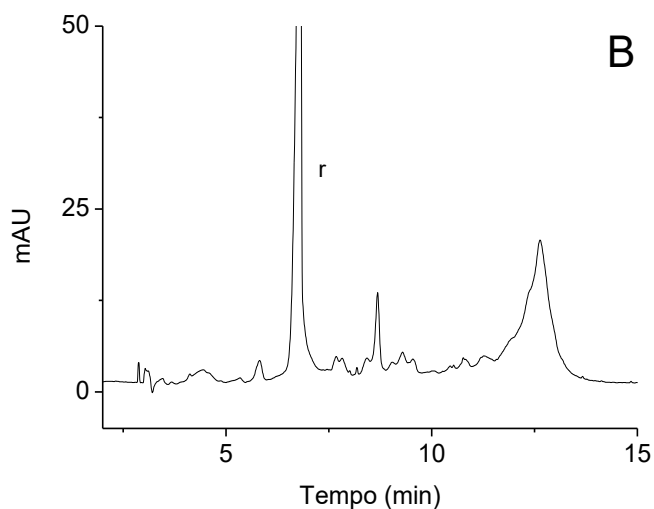
de separação foi investigado no intervalo de 15 - 25 mmol L<sup>-1</sup>. O aumento da concentração de TBS não proporcionou resultados satisfatórios em relação à separação dos AG (resultados não mostrados).

Como já mencionado, a adição de solventes ao eletrólito de corrida é uma boa ferramenta para a manipulação da separação, já que pode melhorar a resolução e eficiência dos compostos (WEINBERGER, 2000). O efeito da adição de MeOH e ACN foi avaliado no sistema de separação. Em MEKC é recomendado o uso de até 20% de solvente no eletrólito, devido ao fato de que valores superiores a este podem ocasionar a quebra da estrutura micelar (ALTRIA, 1996), razão pela qual optou-se pelo uso de 10 % de ACN (Figura 25, A) e 10% de MeOH (Figura 25 B) no eletrólito constituído de 15 mmol L<sup>-1</sup> de TBS e 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 9,4. A concentração de SDS foi mantida em 50 mmol L<sup>-1</sup> para evitar longos tempos de análise, uma vez que o aumento da concentração de SDS, associado à presença de solventes orgânicos pode reduzir demasiadamente o fluxo eletrosmótico e, conseqüentemente, aumentar o tempo de migração dos compostos.

**Figura 25.** Efeito da ACN e MeOH no sistema de separação





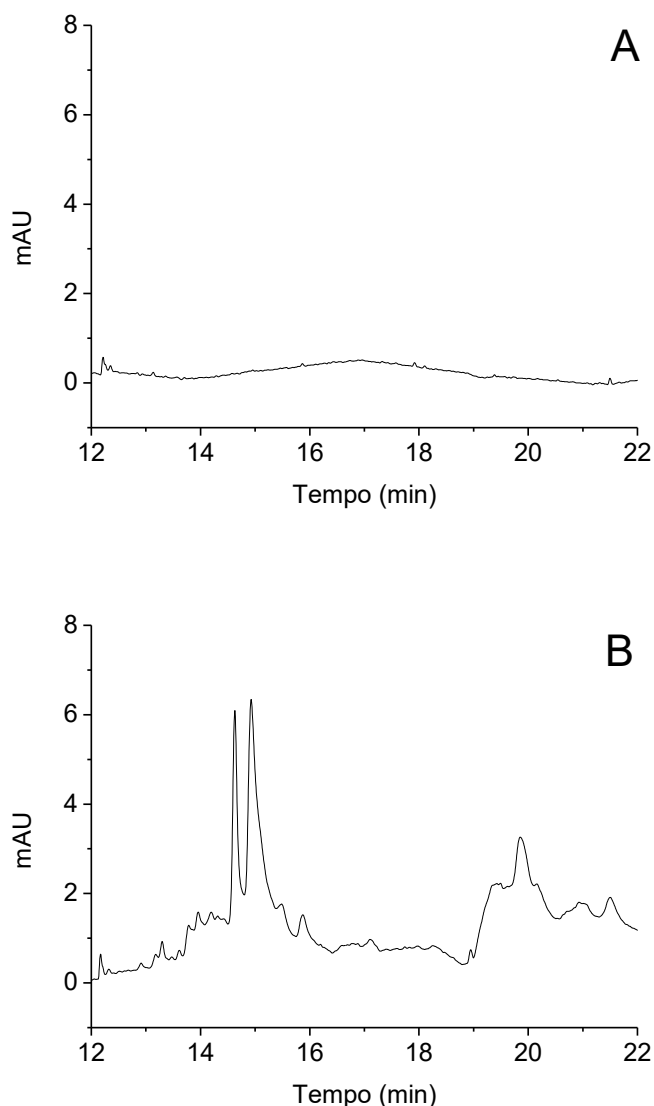


Legenda: eletroferograma da mistura de sulfato de GM e PM 200,0 mg L<sup>-1</sup> em água. Condições: Eletrólito: 15 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 9,4 e (A) 10% de ACN e (B) 10 % de MeOH. Temperatura: 25 °C. Tensão: 25 kV. Injeção: 50 mbar x 6 s. Capilar de 75 µm d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo). Detecção: 206 nm. Identificação dos picos: (r) reagente Fonte: elaborado pelo autor.

Apesar de a adição de solventes orgânicos ao eletrólito de corrida ter proporcionado uma pequena separação de diferentes componentes presentes na mistura, não foi observada uma separação completa dos AG. Outras desvantagens observadas foram o aumento no tempo de corrida, a diminuição da magnitude do sinal analítico da GM/PM e a forma irregular dos picos.

Embora outras variações no eletrólito de corrida tenham sido avaliadas, todos os componentes da GM coeluíram em um único pico e, além disso, não foi possível a separação de seus componentes da PM.

Devido à possibilidade de os adutos MBSC-GM e MBSC-PM, em pH ácido, estarem protonados, foi testado o modo FSCE, utilizando como eletrólito ácido fosfórico pH 2,5 ajustado com TEA (Figura 26).

**Figura 26.** Avaliação do modo FSCE utilizando MBSC

Legenda: eletroferograma (A) do branco e (B) da mistura de sulfato de GM e PM 200,0 mg L<sup>-1</sup> em água. Condições: Eletrólito: 50 mmol L<sup>-1</sup> de ác. Fosfórico pH 2,5 ajustado com TEA. Temperatura: 25 °C. Tensão: 10 kV. Injeção: 50 mbar x 4 s. Capilar de 75 µm d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo). Detecção: 206 nm. Fonte: elaborado pelo autor.

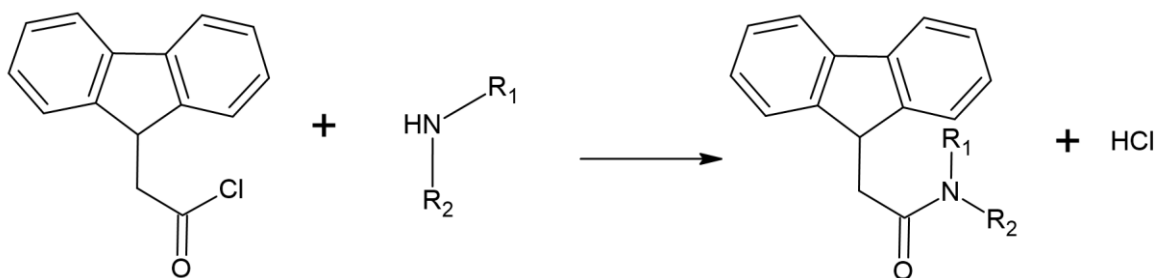
A Figura 26 B confirma a suposição de que os adutos possuem carga, entretanto, não foi dada continuidade aos experimentos devido à baixa magnitude do sinal analítico nessas condições.

Vale ressaltar que essa foi a primeira vez que o MBSC foi utilizado com êxito para derivatização da GM e que seu aduto foi identificado por CE-DAD, em MEKC.

#### 4.1.3. Cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl)

O procedimento de derivatização entre FMOC-Cl e os aminoglicosídeos (Figura 27) foi feito com base na literatura (STEAD; RICHARDS, 1996; KHAN; KUMAR, 2011).

**Figura 27.** Reação de derivatização entre FMOC-Cl e amina



Adaptado de: CHANG & YU, (2011)

Com o objetivo de avaliar a separação dos adutos formados pela reação entre GM/PM e FMOC-Cl, diferentes composições dos eletrólitos de corrida foram testadas nos modos MEKC e FSCE (Quadro 8).

**Quadro 8.** Condições analíticas avaliadas para o FMOC-Cl

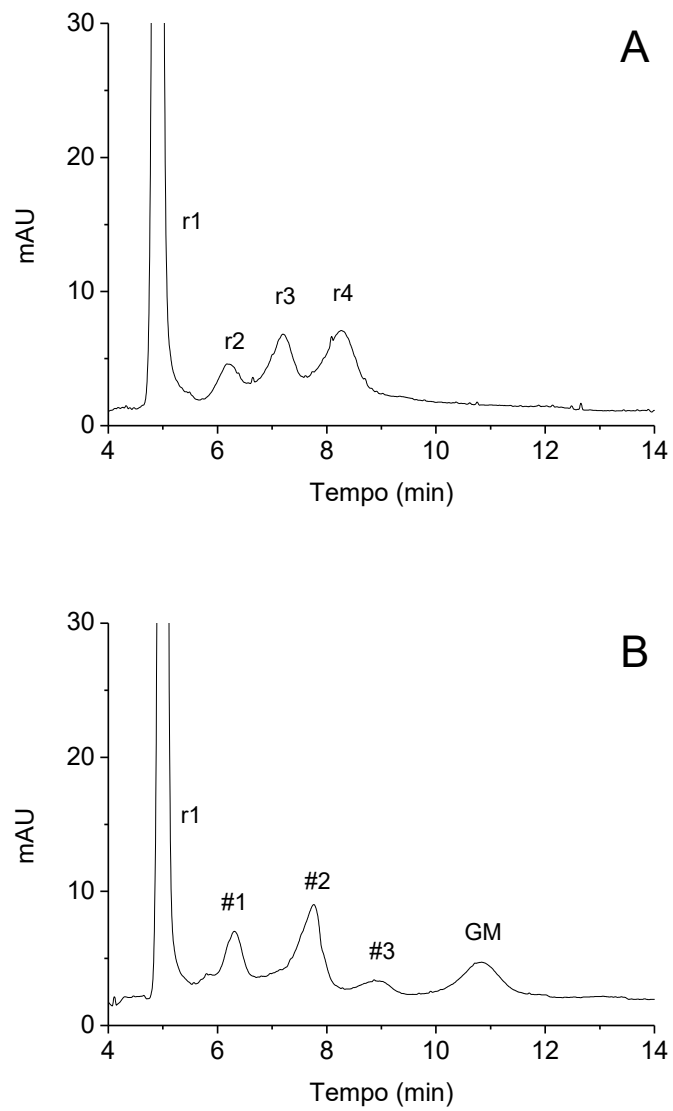
Variável	Faixa do teste	Condição otimizada	Figura
<b>Condições analíticas e instrumentais para separação</b>			
<b><u>MEKC</u></b>			
[SDS] no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	50-90	-	-
[TBS] no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	15-25	-	-
ACN (%)	5-10	10	Figura 28
MeOH (%)	10	-	-
<b><u>FSCE</u></b>			
50 mmol L <sup>-1</sup> de fosfato pH 2,5	-	-	-
50 mmol L <sup>-1</sup> de ácido fosfórico/ TEA	-	-	-
50 mmol L <sup>-1</sup> de fosfato pH 7	-	-	Figura 29

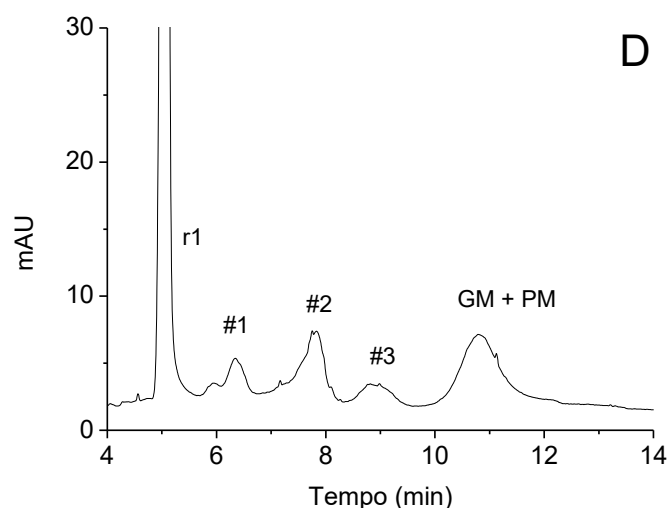
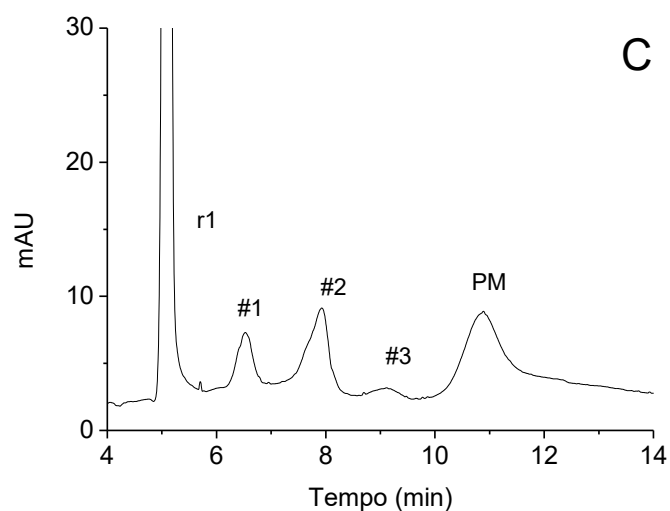
Fonte: Elaborado pelo autor

No modo MEKC, esse derivatizante apresentou algumas desvantagens, como picos interferentes no branco da solução (Figura 28 A), baixa magnitude do sinal analítico e coeluição entre a GM e PM (Figura 28 D). Os resultados mais promissores foram obtidos utilizando o eletrólito constituído de 20 mmol L<sup>-1</sup> de TBS, contendo 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 10 % ACN, pH 9,4, condições nas quais foi possível visualizar que a reação de derivatização ocorreu. Apesar de outras variações nos parâmetros

analíticos (adição de  $\beta$ -CD) e instrumentais (temperatura e tensão) terem sido testadas (resultados não mostrados), não foi possível separar os adutos da PM e GM nesse sistema.

**Figura 28.** Separação em modo MEKC



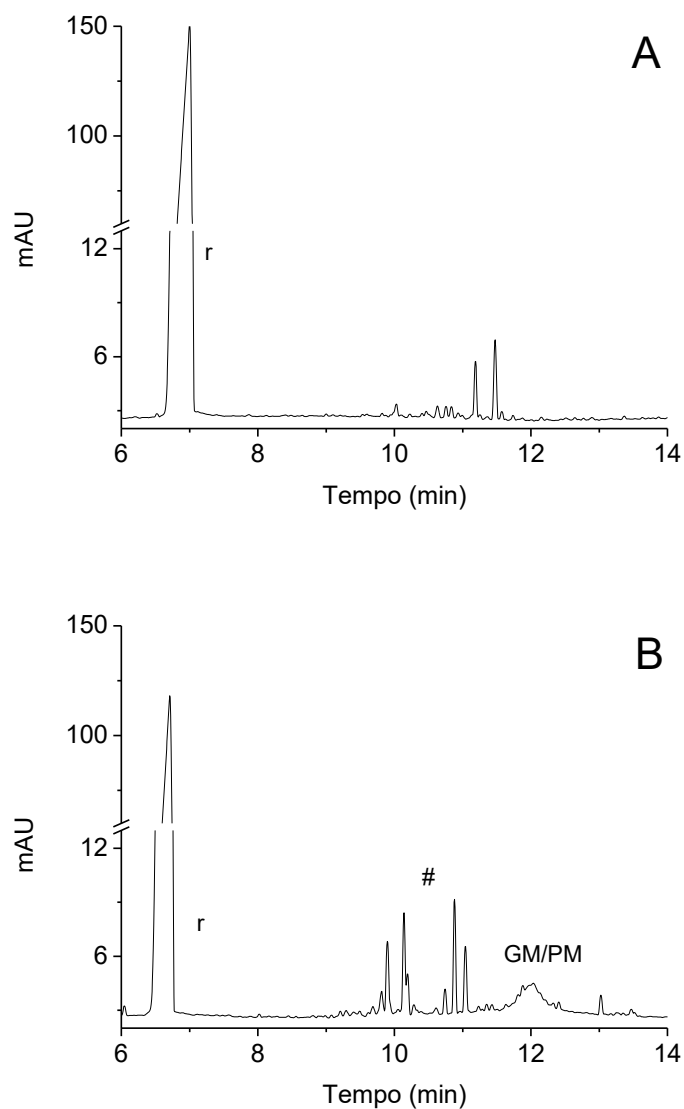


Legenda: eletroferograma (A) do branco da solução, (B) do padrão de 100,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM (C) do padrão de 100,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de PM e (D) da mistura de 100,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM e PM. Condições: Eletrólito: 15 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 10% de ACN, pH 9,4. Temperatura: 25 °C. Tensão: 21 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de 75 µm d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo). Detecção: 260 nm. Identificação dos picos: (#1, #2 e #3) picos desconhecidos, (r) reagente. Fonte: elaborado pelo autor.

Os experimentos em FSCE, utilizando 50 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato pH 2,5 ou 50 mmol L<sup>-1</sup> de ácido fosfórico, ajustado com TEA pH 2,5 não apresentaram resultados satisfatórios, pois não houve aparecimento de nenhum pico referente aos analitos avaliados (resultados não mostrados). Esse fenômeno pode estar relacionado à natureza não catiônica dos adutos FMOC-GM e FMOC-PM. Além disso, quando os testes foram feitos utilizando 50 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato pH 7,0 como eletrólito de corrida (FSCE), foi possível visualizar o pico desses compostos coeludindo em 12 min,

evidenciando, assim, que os adutos não apresentam cargas em suas estruturas (Figura 29).

**Figura 29.** Separação em modo FSCE



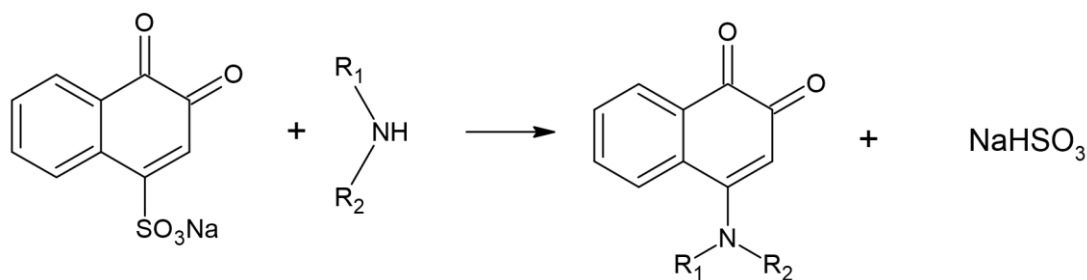
Legenda: eletroferograma (A) do branco da solução, (B) da mistura de 50,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM e PM. Condições: Eletrólito: 50 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato, pH 7,0. Temperatura: 25 °C. Tensão: 20 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de 75 µm d.i x 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo). Detecção: 260 nm. Identificação dos picos (r) reagente (#) desconhecidos Fonte: elaborado pelo autor.

Considerando que todos os experimentos, envolvendo tanto os parâmetros analíticos quanto os instrumentais, não resultaram em um sistema de separação satisfatório, o uso do FMOC-Cl foi desconsiderado para os próximos testes.

#### 4.1.4. Ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (NQS)

As aminas primárias e secundárias reagem com NQS para formar adutos com máximo de absorção em 239 m (Figura 30). O procedimento de derivatização entre o reagente NQS e os AG foi feito com base na literatura (PORTNA; VASYUK; KORZHOVA, 2015).

**Figura 30.** Reação de derivatização entre NQS e aminas



Fonte: ELBASHIR et al., (2012)

O Quadro 9 apresenta as condições analíticas e instrumentais que foram avaliadas para esse agente derivatizante.

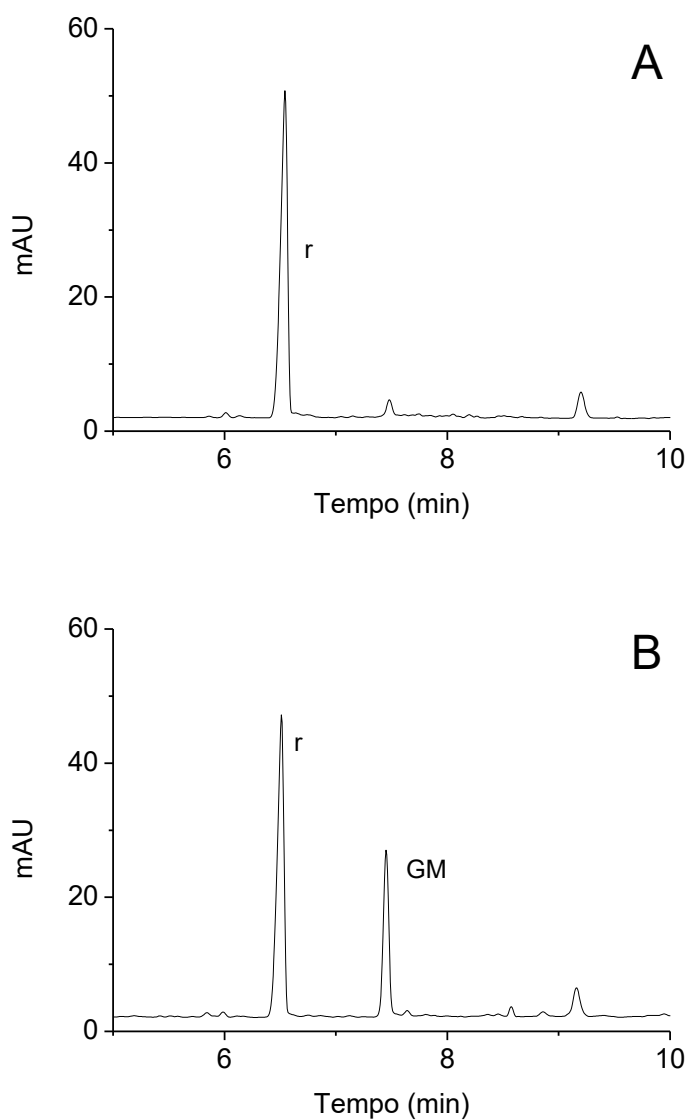
**Quadro 9.** Condições analíticas avaliadas para o NQS.

<i>Variável</i>	<i>Faixa do teste</i>	<i>Condição otimizada</i>	<i>Figura</i>
<b>Condições analíticas e instrumentais para separação</b>			
<b><u>MEKC</u></b>			
[SDS] no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	50-75	-	Figura 31
β-ciclodextrina no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	15	-	Figura 32 A
ACN (%)	10	-	
MeOH (%)	10	-	Figura 32 B
EtOH (%)	10	-	Figura 32 C
Álcool isopropílico (%)	10	-	
Ureia (mol L <sup>-1</sup> )	3	-	
Temperatura (°C)	20-30	-	
pH	4,6 – 9,4	-	Figura 33
<b><u>FSCE</u></b>			
20 mmol L <sup>-1</sup> de fosfato pH 2,6	-	-	
40 mmol L <sup>-1</sup> de fosfato pH 9,4	-	-	
40 mmol L <sup>-1</sup> de fosfato + 10% álcool isopropílico pH 9,4	-	-	
40 mmol L <sup>-1</sup> de fosfato + 10% álcool isopropílico pH 10,5	-	-	

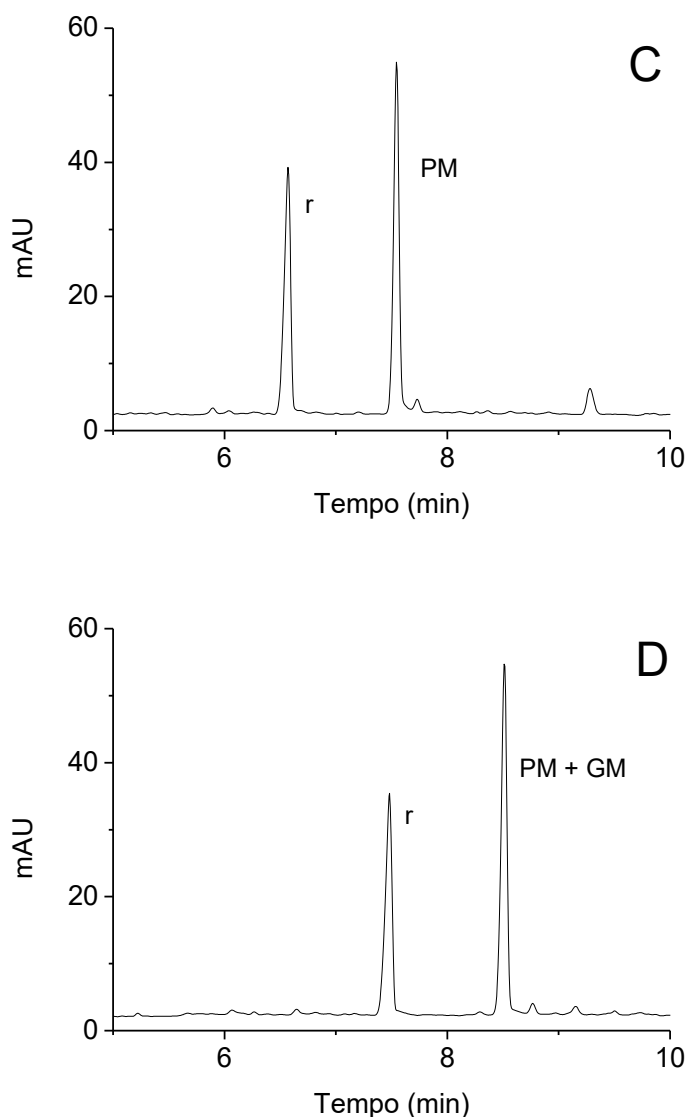
Fonte: elaborado pelo autor

Para avaliar se ocorreu a formação dos adutos AG-NQS, selecionou-se, como eletrólito de corrida, uma mistura de 20 mmol L<sup>-1</sup> de TBS e 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 9,4. Foi possível observar (Figura 31) que a reação de derivatização ocorreu para ambos os AG e que a magnitude do sinal analítico foi maior para a PM do que para a GM. No entanto, os dois compostos apresentaram o mesmo tempo de migração, mesmo quando a concentração de SDS foi de 75 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 31 D). Essa concentração de SDS pode não ter sido suficiente para proporcionar alguma mudança no sistema de separação, porém, não foram avaliadas concentrações superiores a esse valor, devido ao aumento da corrente do sistema.

**Figura 31.** Separação em modo MEKC

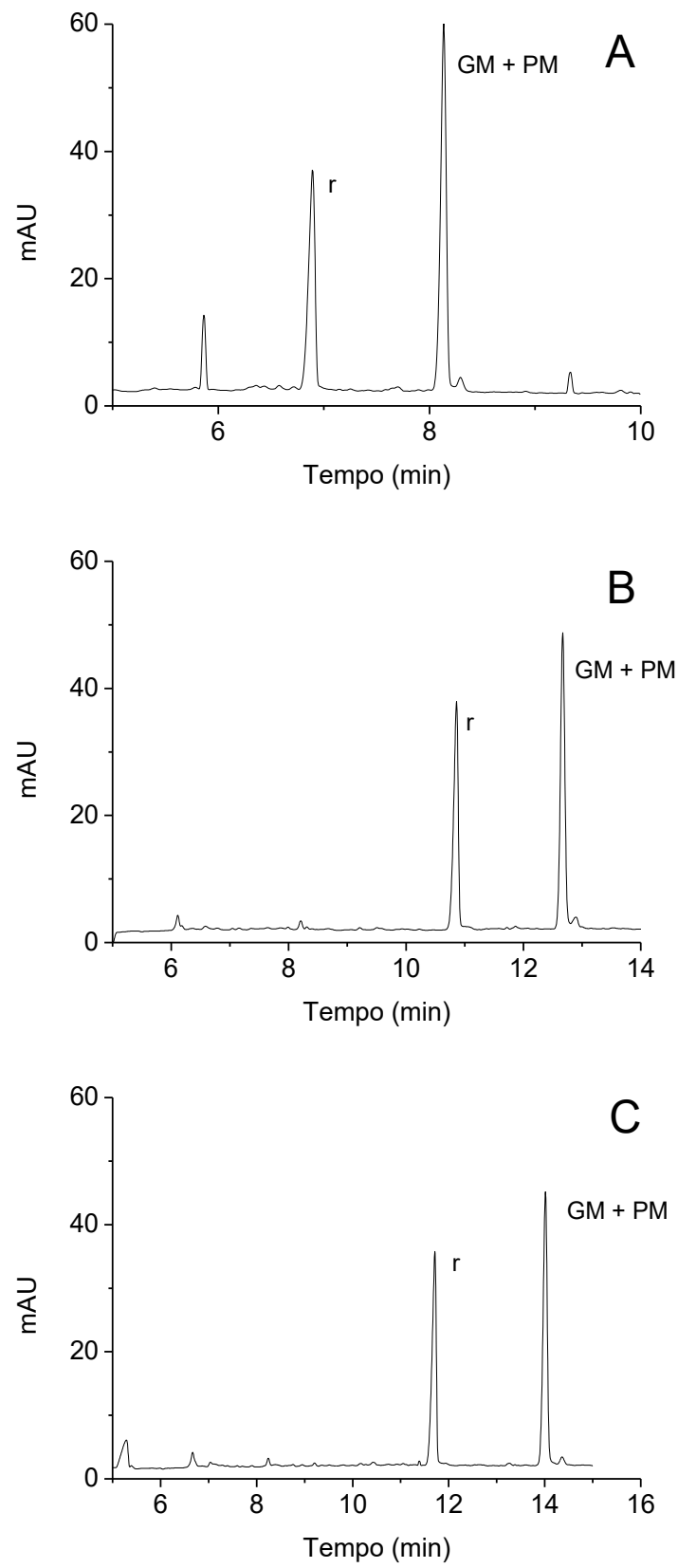






Legenda: eletroferograma (A) do branco da solução, (B) 100,0 mg L<sup>-1</sup> de GM base (C) 100,0 mg L<sup>-1</sup> de PM base (D) 100,0 mg L<sup>-1</sup> de PM e GM base. Condições: (A), (B), (C) Eletrólito: 20 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 9,4. (D) 20 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 75 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 9,4. Temperatura: 25 °C. Tensão: 19 kV. Injeção: 30 mbar x 5 s. Capilar de 75 µm d.i x 52,5 cm de comprimento total (44 cm de comprimento efetivo). Detecção: 239nm. Identificação dos picos: (r) reagente, (PM) paromomicina, (GM) gentamicina. Fonte: elaborado pelo autor.

Para tentar otimizar o sistema de separação, diferentes modificadores foram adicionados ao eletrólito de corrida. A adição de aditivos, como solventes orgânicos e β-CD ao eletrólito de corrida, tem sido uma opção versátil e efetiva para manipular a seletividade em MEKC (OTSUKA; TERABE, 1998). A Figura 32 apresenta os resultados obtidos para a adição de β-CD (Figura 32 A), adição de metanol (Figura 32 B) e adição de etanol (Figura 32 C).

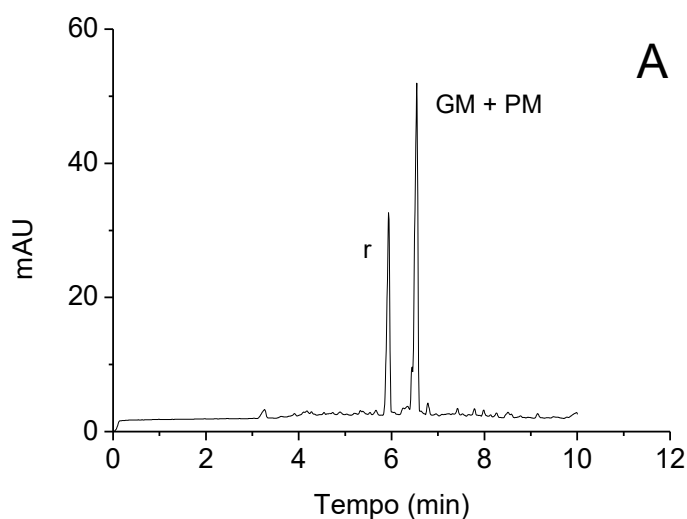
**Figura 32.** Efeito de alguns modificadores no sistema de separação

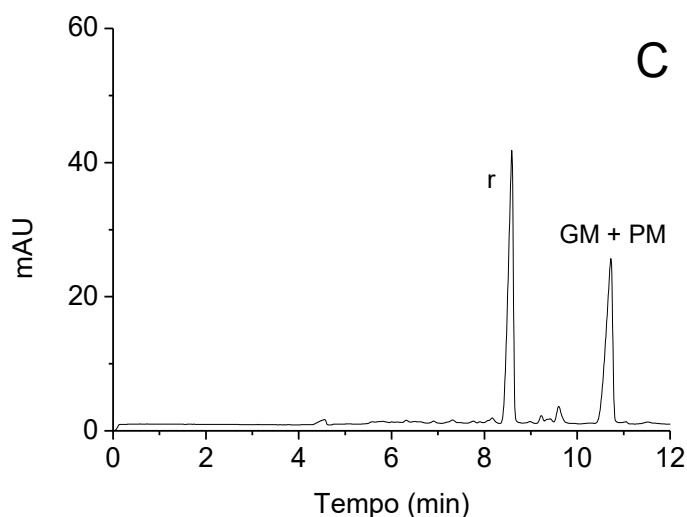
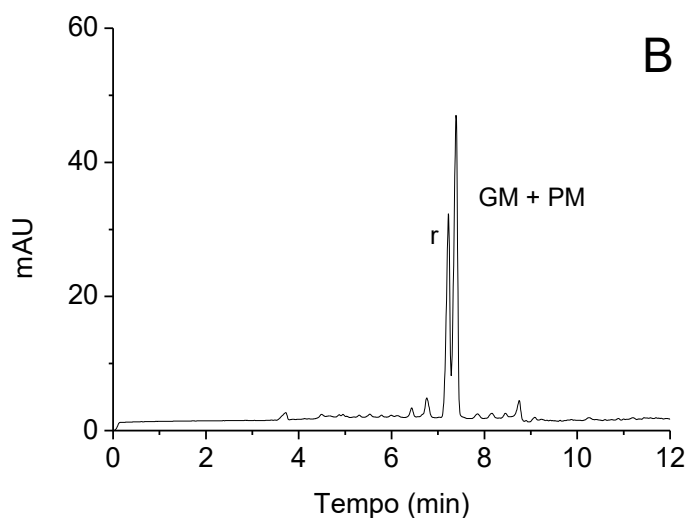
Legenda: eletroferogramas da mistura de 100,0 mg L<sup>-1</sup> de GM e PM base. Condições: Eletrólito: (A) 20 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 15 mmol L<sup>-1</sup> de β-CD, pH 9,4. (B) 20 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 10 % MeOH, pH 9,4 (C) 20 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 10 % EtOH, pH 9,4. Temperatura: 25 °C. Tensão: 19 kV. Injeção: 30 mbar x 5 s. Capilar de 75 μm d.i x 52,5 cm de comprimento total (44 cm de comprimento efetivo). Detecção: 239 nm. Identificação dos picos: (r):reagente, (GM + PM):paromomicina e gentamicina. Fonte: elaborado pelo autor.

Diferentemente de todos os outros agentes derivatizantes avaliados neste trabalho, o NQS é altamente solúvel em água. Portanto, é provável que, por esse motivo, não tenha ocorrido nenhuma mudança na interação entre os solutos e as fases micelar/ aquosa com a adição dos modificadores.

Outro parâmetro que pode ser utilizado para manipular a seletividade do sistema de separação em MEKC é o pH. Cabe lembrar que o efeito do pH na seletividade é mais efetivo para solutos ionizáveis do que para solutos neutros (OTSUKA; TERABE, 1998; RIEKKOLA, 2000). Além disso, mudanças no valor de pH do eletrólito de corrida, especialmente em regiões de menores valores de pH, promovem uma mudança significativa na velocidade do EOF. Apesar de não terem sido encontradas informações na literatura sobre a possibilidade de os adutos formados serem ionizáveis, o efeito do pH no sistema de separação foi avaliado. Inicialmente, os valores foram: 7,6; 6,6; 5,6 e 4,6, mantendo constantes as condições instrumentais (temperatura, tensão e injeção). O eletrólito de corrida foi constituído de acetato e SDS. A Figura 33 apresenta os resultados obtidos.

**Figura 33.** Efeito do pH no sistema de separação





Legenda: eletroferogramas da mistura de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de GM e PM base. Condições: Eletrólito:  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão acetato contendo  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, (A) pH 7,6 (B) pH 6,6 e (C) pH 5,6. Temperatura:  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tensão: 19 kV. Injeção: 30 mbar x 5 s. Capilar de  $75 \text{ }\mu\text{m}$  d.i x 52,5 cm de comprimento total (44 cm de comprimento efetivo). Detecção: 239nm. Identificação dos picos: (r) reagente, (GM + PM) paromomicina e gentamicina. Fonte: elaborado pelo autor.

Com a redução nos valores de pH, não foi observada melhora na resolução entre os picos da GM-NQS e PM-NQS, entretanto, houve um aumento no tempo de migração, comportamento provavelmente relacionado à redução de velocidade do EOF. As micelas carregadas negativamente migram em direção ao eletrodo de carga oposta (anodo), devido à sua velocidade eletroforética, mas se a magnitude do EOF for maior, elas são arrastadas pelo EOF em direção ao catodo (-) e possuem uma velocidade de migração da micela no mesmo sentido que o EOF. Se a velocidade do EOF diminui, as micelas resistem mais a serem arrastadas em direção à detecção e,

consequentemente, ocorre um aumento no tempo de migração. Quando o valor de pH do eletrólito de corrida foi ajustado para 4,6, não foram observados a presença de picos nos eletroferogramas (branco e mistura padrão) no tempo de análise avaliado. Uma hipótese é que o tempo de corrida utilizado não foi suficiente para a visualização dos analitos no sistema.

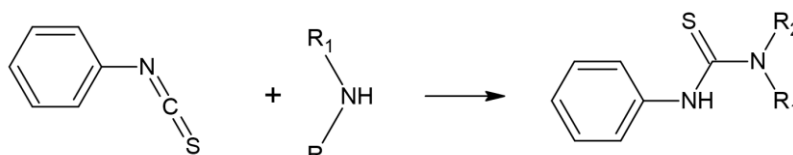
Já que os resultados para o modo MEKC não foram satisfatórios, a próxima etapa consistiu em avaliar o comportamento do sistema no modo FSCE. Para esse teste, foi utilizado como eletrólito de corrida 20 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato e pH 2,6. Os eletroferogramas do branco e da mistura padrão de PM/GM não foram apresentados, pois não foram observados picos referentes aos analitos de interesse, evidenciando que os adutos não são ionizáveis nesses valores de pH.

Após todos os experimentos realizados com o NQS, conclui-se que o reagente não apresenta potencial para ser utilizado em CE-DAD nas condições testadas.

#### 4.1.5. Isotiocianato de Fenila (PITC)

O agente derivatizante PITC reage com aminas primárias e secundárias para formar adutos que apresentam absorção na região do UV no intervalo de 240 - 253 nm (Figura 34).

**Figura 34.** Reação de derivatização entre PITC e amina



Fonte: adaptado de KAMAREI; EBRAHIMZADEH; ASGHARINEZHAD, (2011)

O Quadro 10 apresenta as condições analíticas e instrumentais avaliadas para o agente derivatizante PITC.

**Quadro 10.** Condições analíticas e instrumentais avaliadas para o método utilizando PITC

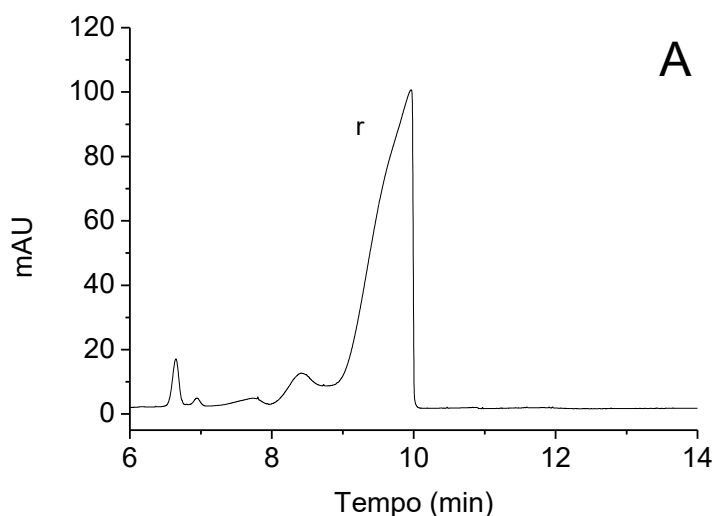
Variável	Faixa do teste	Condição otimizada	Figura
<b>Condições analíticas e instrumentais para separação</b>			
<b><u>MEKC</u></b>	-	-	-
<b><u>SDS (capilar de 75 µm d.i)</u></b>	-	-	-
[SDS] no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	30-50	-	-
[TBS] no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	20-30	-	-
β-ciclodextrina no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	5-15	-	-
ACN (%)	10	-	Figura 36 A
MeOH (%)	10	-	Figura 36 B
Ureia (mol L <sup>-1</sup> )	2-4	-	Figura 38
B-CD sulfatada	-	-	-
Temperatura (°C)	17-30	-	-
<b><u>SDS (capilar de 50 µm d.i)</u></b>	-	-	-
[SDS] no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	25-35	-	-
[TBS] no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	25-35	-	-
ACN (%)	0-2	-	-
<b><u>CTAB (capilar de 75 µm d.i)</u></b>	-	-	-
pH	3,6 – 9,4	-	-
<b><u>FSCE</u></b>	-	-	-
50 mmol L <sup>-1</sup> de fosfato pH 2,6	-	-	-

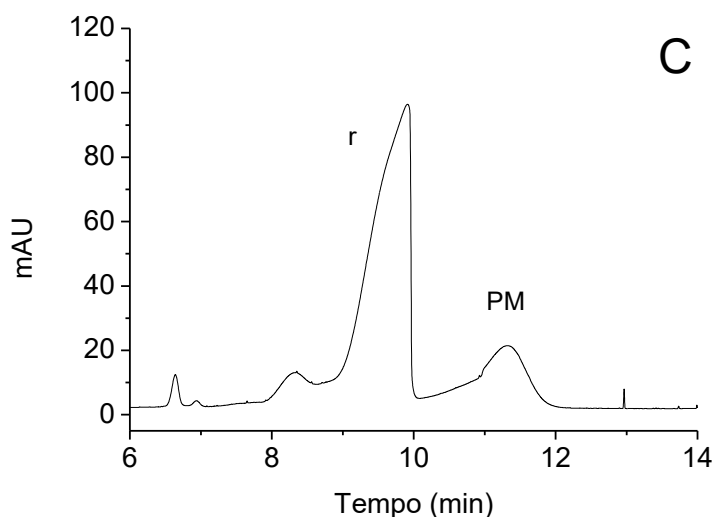
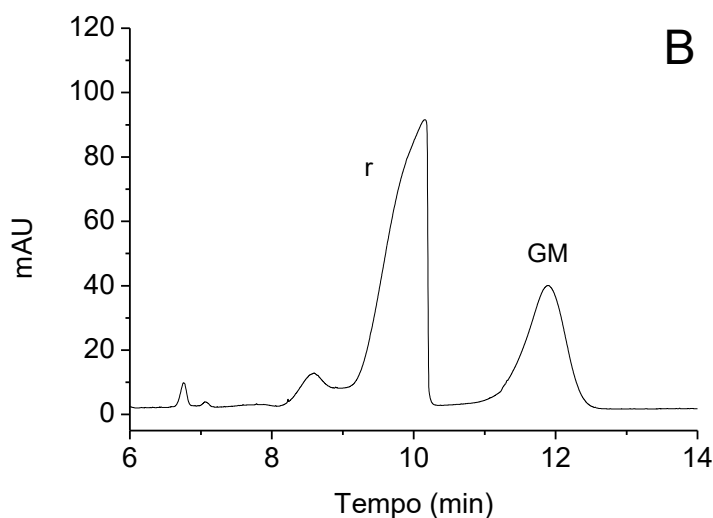
Fonte: elaborado pelo autor

Inicialmente, foi avaliado o modo FSCE utilizando como eletrólito de corrida uma solução em meio ácido, com o objetivo verificar se os adutos PITC-GM e PITC-PM seriam capazes de adquirir carga positiva nas seguintes condições: eletrólito contendo  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de fosfato, pH 2,6, temperatura de  $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , tensão de 15 kV, injeção de 30 mbar x 7 s, utilização de capilar de  $75 \text{ }\mu\text{m d.i x 52,5 cm}$  de comprimento total e detecção em 240 nm. Não foram observados picos nos eletroferogramas do branco e da mistura padrão (tempo de análise de 30 min) e, por esse motivo, os resultados não foram mostrados.

A próxima etapa consistiu em avaliar o comportamento do sistema utilizando o modo MEKC. A Figura 35 apresenta os resultados preliminares, utilizando como eletrólito de corrida uma mistura contendo  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão fosfato e  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS em pH 9,4.

**Figura 35.** Separação em modo MEKC





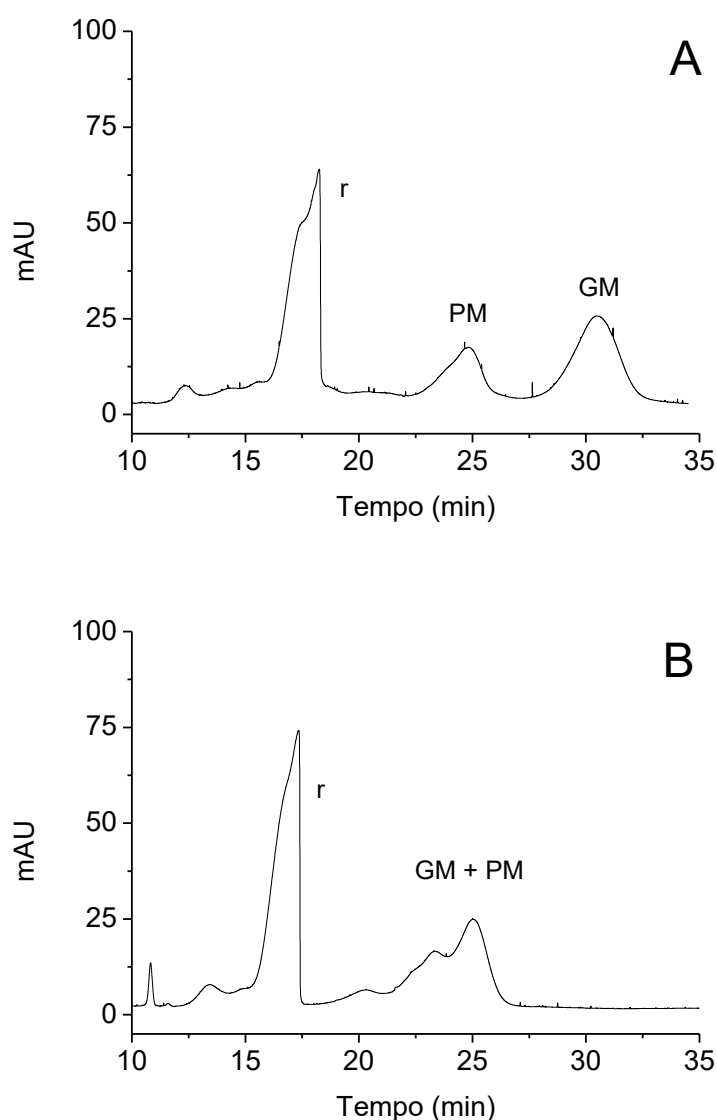
Legenda: eletroferogramas do (A) branco da solução (B) padrão de  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  de GM base-e (C) padrão de  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  de PM base. Condições: Eletrólito:  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de fosfato contendo  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 9,4. Temperatura:  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tensão:  $15 \text{ kV}$ . Injeção:  $30 \text{ mbar} \times 7 \text{ s}$ . Capilar de  $75 \text{ } \mu\text{m}$  d.i x  $47 \text{ cm}$  de comprimento total ( $38,5 \text{ cm}$  de comprimento efetivo). Detecção:  $240 \text{ nm}$ . Identificação dos picos: (r) reagente, (GM) gentamicina, (PM) paromomicina. Fonte: elaborado pelo autor.

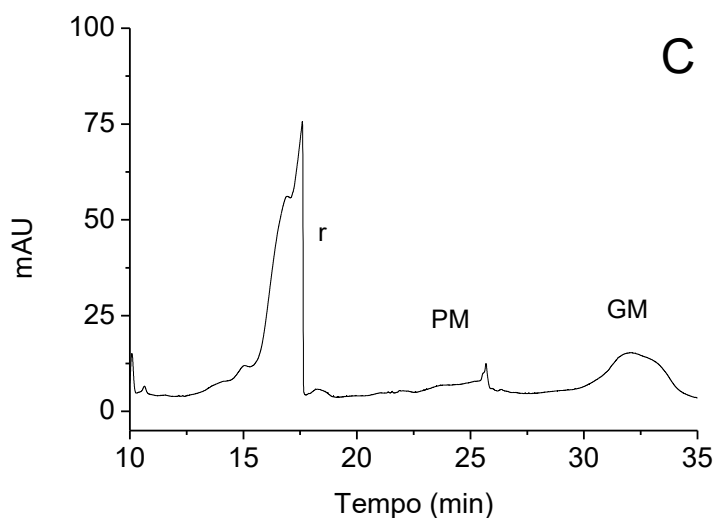
Com base na Figura 35, foi possível observar que houve formação dos adutos, tanto para a PM quanto para a GM, sendo que a magnitude do sinal analítico foi maior para GM. No entanto, os compostos apresentam tempos de migração semelhantes, o que resultou na coeluição deles. Com o objetivo de otimizar a separação, diferentes modificadores foram adicionados ao eletrólito de corrida. Os testes preliminares foram feitos avaliando a presença de ACN no intervalo de concentração de 5 - 8% v/v e  $\beta$ -CD no intervalo de 5 -  $15 \text{ mmol L}^{-1}$ .



Os resultados preliminares (não mostrados) sugerem que a presença de  $\beta$ -CD no eletrólito de corrida não proporcionou nenhuma melhora no sistema de separação, entretanto, a presença de ACN se mostrou promissora para as próximas etapas de otimização. Por esse motivo, os próximos experimentos consistiram em avaliar três eletrólitos diferentes: mistura de TBS com SDS contendo: i) 10% ACN; ii) 10% MeOH e iii) 10% ACN + 5 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD. A Figura 36 apresenta os resultados obtidos para esses experimentos.

**Figura 36.** Efeito da composição do eletrólito no sistema de separação.

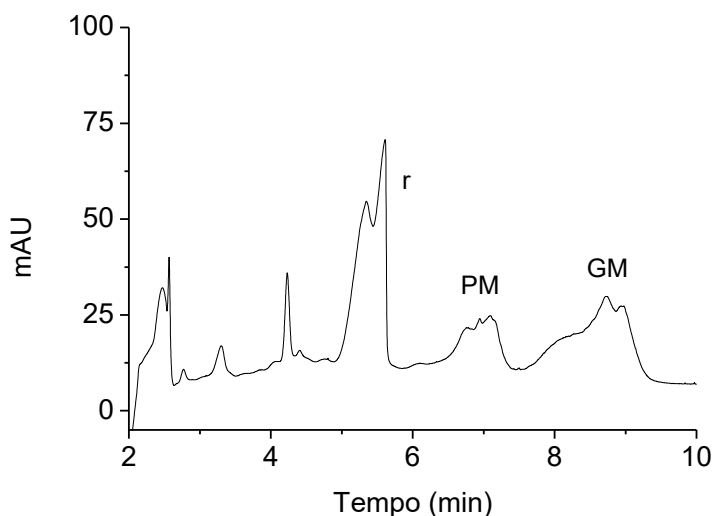




Legenda: eletroferogramas da mistura de 100,0 mg L<sup>-1</sup> de GM e PM base. Condições: Eletrólito: 30 mmol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato, pH 9,4 e 50 mmol L<sup>-1</sup> de SDS contendo (A) 10 % ACN (B) 10 % MeOH e (C) 10 % ACN e 5 mmol L<sup>-1</sup> de β-CD. Temperatura: 27 °C. Tensão: 15 kV. Injeção: 30 mbar x 7 s. Capilar de 75 μm d.i x 47 cm de comprimento total (38,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 240 nm. Identificação dos picos: (r) reagente, (GM) gentamicina, (PM) paromomicina. Fonte: elaborado pelo autor.

Foi possível observar (Figura 36) que o melhor resultado foi com a adição de 10% v/v de ACN ao eletrólito de corrida, o que proporcionou a completa separação entre os adutos PITC-GM e PITC-PM. A presença de MeOH não proporcionou um efeito satisfatório, devido ao aumento na coeluição dos adutos, e o eletrólito contendo a mistura de ACN e β-CD também não apresentou bons resultados, devido à redução da magnitude do sinal analítico e irregularidade no formato dos picos.

Apesar de ocorrer a separação dos picos utilizando ACN, o tempo de análise foi cerca de 35 min, característica pouco desejável em laboratórios de rotina. Visando a reduzir o tempo de análise, o comprimento da coluna capilar foi reduzido, mantendo constantes as condições analíticas e instrumentais (Figura 37).

**Figura 37.** Efeito do comprimento da coluna no sistema

Legenda: eletroferograma da mistura de  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  de GM e PM base. Condições: Eletrólito:  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de TBS contendo  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS e 10% ACN, pH 9,4. Temperatura:  $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tensão: 18 kV. Injeção: 30 mbar x 7 s. Capilar de  $75 \text{ }\mu\text{m}$  d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 240 nm. Identificação dos picos: (r) reagente, (GM) gentamicina, (PM) paromomicina. Fonte: elaborado pelo autor.

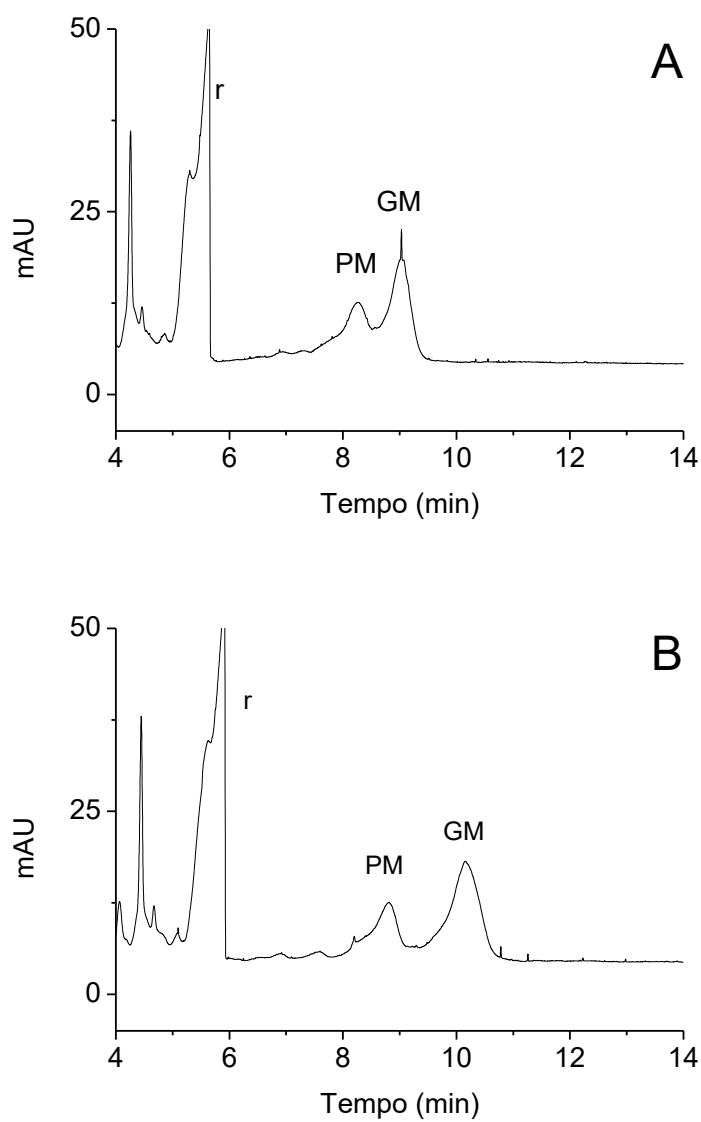
A redução do comprimento da coluna capilar proporcionou um menor tempo de análise, entretanto, foi observado um alargamento e irregularidade na forma dos picos, comportamento que pode estar relacionado ao começo da separação dos componentes da PM e GM. No entanto, diminuir o capilar ainda mais pode ocasionar um aumento na corrente e, conseqüentemente, o surgimento do efeito Joule, uma vez que a dissipação de calor depende do comprimento e diâmetro do capilar, bem como da tensão aplicada (EVENHUIS; HADDAD, 2009) e, por esse motivo, não foram realizados testes com outros comprimentos.

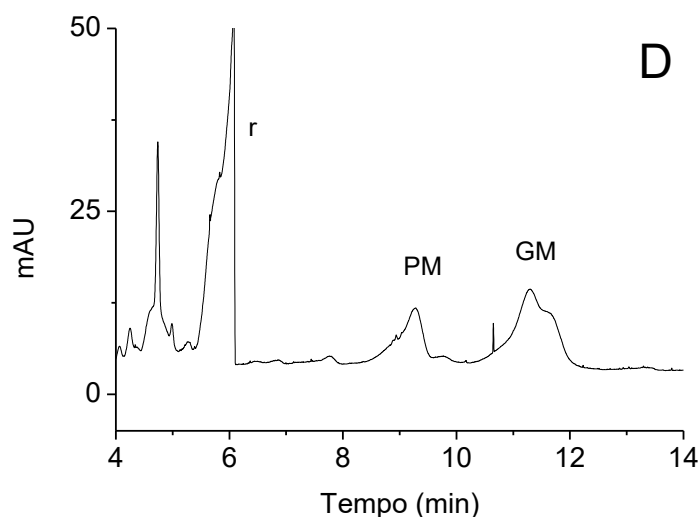
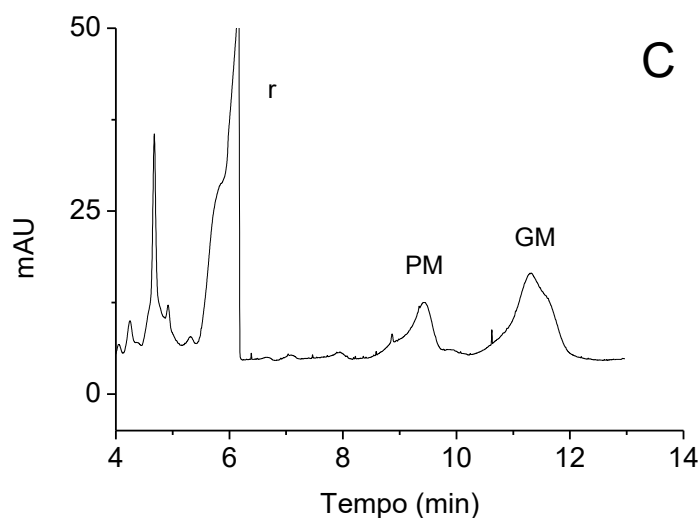
A próxima etapa consistiu em manter o comprimento da coluna capilar e avaliar a adição de ureia no eletrólito de corrida. De acordo com a literatura, a ureia é um aditivo empregado na solubilização de compostos hidrofóbicos (ALTRIA, 1996). O efeito desse composto na solubilização em soluções micelares ainda não é completamente compreendido, no entanto, sabe-se que a adição da ureia diminui o fator de capacidade da maioria dos analitos em MEKC (TERABE et al., 1991).

O efeito da ureia no sistema de separação foi avaliado no intervalo de 2,0 a  $4,0 \text{ mol L}^{-1}$  (Figura 38). No entanto, devido às constantes quedas de corrente no sistema, que podem ter ocorrido devido à falta de solubilização da amostra no

eletrólito, acrescentou-se 2% v/v de ACN. Se a amostra não for completamente solúvel no eletrólito de corrida, ela poderá precipitar-se dentro do capilar e causar o entupimento do mesmo ou desestabilização na corrente (BENEDEK; GUTTMAN, 2000).

**Figura 38.** Efeito da ureia no sistema de separação





Legenda: eletroferograma da mistura de 100,0 mg L<sup>-1</sup> de GM e PM base. Condições: Eletrólito: 30 mmol L<sup>-1</sup> de TBS, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS e 2% ACN, pH 9,4 contendo (A) 2 mol L<sup>-1</sup> de ureia (B) 3 mol L<sup>-1</sup> de ureia (C) 3,5 mol L<sup>-1</sup> de ureia (D) 4 mol L<sup>-1</sup> de ureia. Temperatura: 27 °C. Tensão: 17 kV. Injeção: 30 mbar x 5 s. Capilar de 75 µm d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 240 nm. Identificação dos picos: (r) reagente, (GM) gentamicina, (PM) paromomicina. Fonte: elaborado pelo autor.

Com base na Figura 38, foi possível observar que o aumento da concentração de ureia no eletrólito de corrida proporcionou melhora na resolução entre os picos dos adutos.

Embora o método tenha sido capaz de separar os compostos de interesse, a magnitude do sinal analítico não justificou a validação do método para posterior aplicação nos sistema de liberação controlada (SLC), uma vez que esse sistema precisa de métodos analíticos mais sensíveis para avaliar a liberação ao longo do

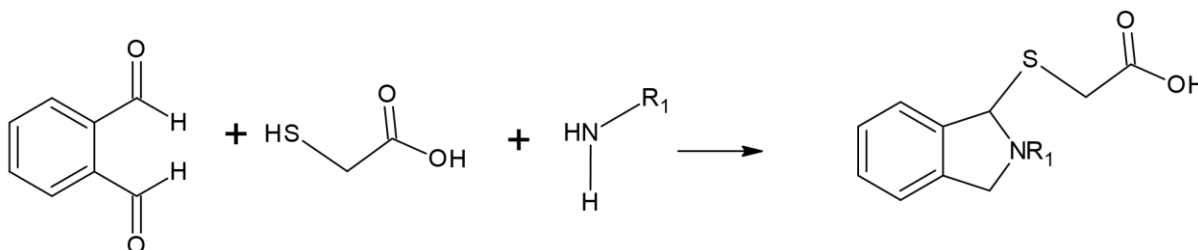
tempo (a quantidade inicialmente liberada costuma ser baixa). Esse método pode ser futuramente validado para a aplicação em amostras farmacêuticas que apresentem concentrações mais altas, assim como futuros testes podem ser realizados para avaliar a separação em outros AG.

Alguns parâmetros analíticos e instrumentais, que estão descritos no Quadro 10, não foram discutidos no texto e isso ocorreu pelo fato de não terem apresentado resultados satisfatórios. Optou-se por apresentar e discutir apenas os resultados que foram mais promissores.

#### 4.1.6. Ortoftaldeído (OPA)

Esse agente derivatizante já foi amplamente descrito na literatura para a determinação de AG, utilizando a CE como técnica analítica, porém, em nenhum desses trabalhos a separação foi feita simultaneamente com GM e PM. O procedimento de derivatização para os AG utilizado neste trabalho foi baseado nos experimentos de Kaale e colaboradores (2000), Wiene e Holzgrabe (2002), Wiene e Holzgrabe (2003) e Kaale e colaboradores (2005). Aminas primárias e secundárias reagem com OPA, na presença de ácido tioglicólico, como descrito na Figura 39. O Quadro 11 apresenta as condições analíticas e instrumentais avaliadas nesse trabalho.

**Figura 39.** Reação entre OPA e aminas na presença de ácido tioglicólico



Adaptado de: WAHL & HOLZGRABE, (2016)

**Quadro 11.** Condições analíticas e instrumentais avaliadas para o método utilizando OPA

<i>Variável</i>	<i>Faixa do teste</i>	<i>Condição otimizada</i>	<i>Figura</i>
<b>Reação de derivatização</b>			
Diferentes preparos do reagente			Figura 40/41
Diferentes derivatizações			Figura 40/41
<b>Condições analíticas e instrumentais para separação</b>			
<b><u>FSCE</u></b>			
[TBS] no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	30 - 50	40	Figura 43
β-ciclodextrina no eletrólito (mmol L <sup>-1</sup> )	3 - 7,5	3	Figura 42
MeOH (%)	12,5 – 15,5	15,5	Figura 45
Comprimento de onda (nm)	230 e 330	230-	-
Tensão (kV)	14,5 – 16	16	-
Temperatura (° C)	21 - 25	23	Figura 44
Condições otimizadas	-	-	Figura 46

Fonte: elaborado pelo autor

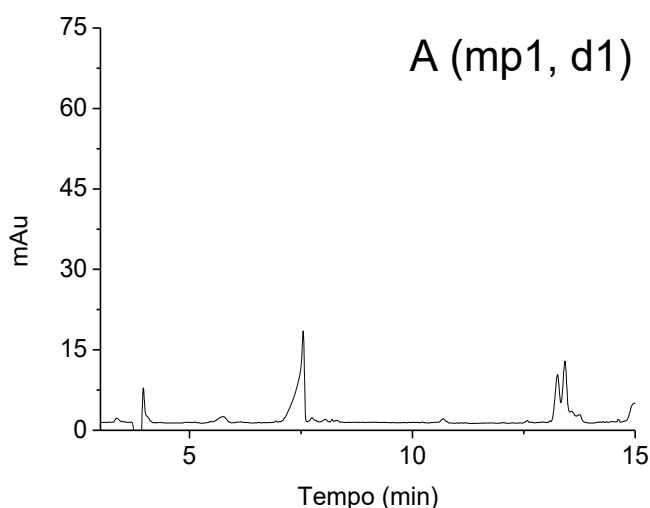
O teste inicial consistiu em avaliar duas diferentes formas de preparo do reagente (mp1 e mp2), bem como de derivatização (d1, d2 e d3).

O preparo denominado mp1 foi realizado dissolvendo 0,520 g de OPA em 2,0 mL de MeOH, sendo adicionados em seguida 15,0 mL de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (30 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH 10,4) e 1040  $\mu\text{L}$  de ácido tioglicólico e ajuste de valor de pH da mistura para 10,4 com 8,0 mol  $\text{L}^{-1}$  de KOH. Por fim, o volume da mistura foi ajustado para 21,0 mL com o mesmo tampão (KAALE et al., 2000).

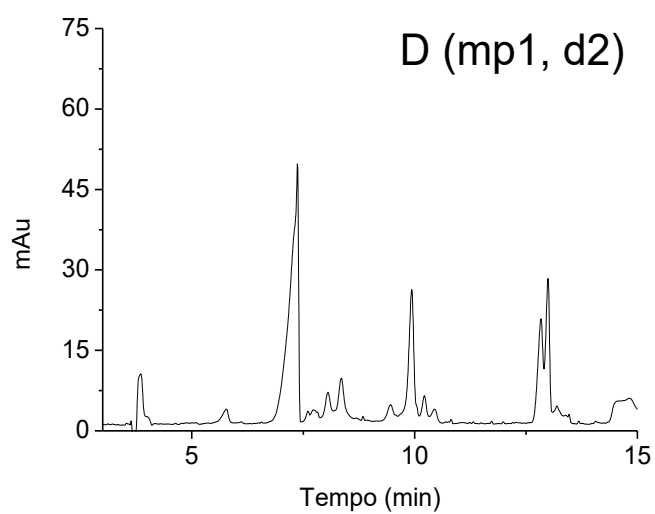
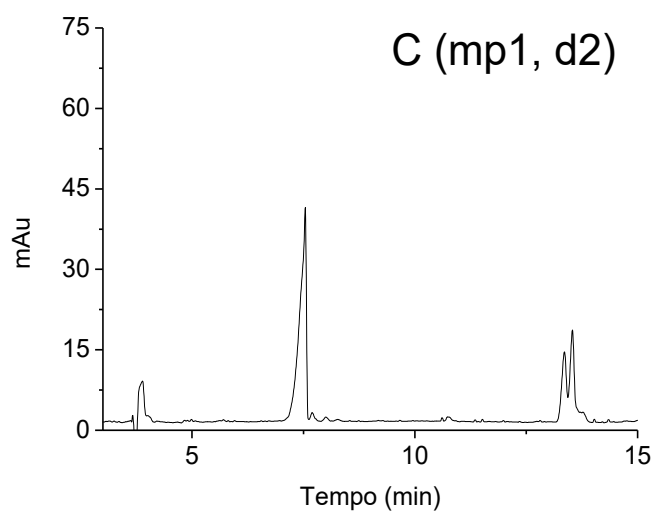
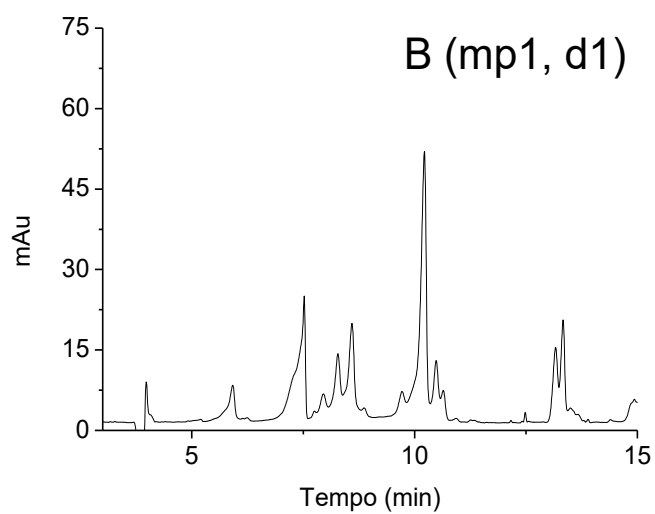
No procedimento utilizado no mp2, uma massa de 0,60 g de OPA foi dissolvida em 2,0 mL de MeOH, também acrescentando 15,0 mL de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (30 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH 11,0), porém a quantidade de ácido tioglicólico foi de 0,5 mL e o pH dessa solução foi ajustada em 11,0 com KOH 8,0 mol  $\text{L}^{-1}$ . O volume final dessa mistura foi de 20,0 mL ajustado com ácido bórico (30 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH 11,0) (KAALE et al., 2005).

O reagente denominado mp1 foi utilizado para dois diferentes procedimentos de derivatização. A derivatização d1 consistiu em misturar 4,0 mL de água (ou padrão em solução aquosa), 2,0 mL de álcool isopropílico e 1,6 mL do reagente (Figura 40, A e B) (KAALE et al., 2005). Já o procedimento de derivatização d2 consistiu em misturar 450  $\mu\text{L}$  de água (ou padrão em solução aquosa), 250  $\mu\text{L}$  de MeOH e 160  $\mu\text{L}$  do reagente (WIENEN; HOLZGRABE, 2003). Essas misturas foram aquecidas 5 min a 40 °C (Figura 40, C e D).

**Figura 40.** Testes com diferentes modos de preparo e derivatização utilizando OPA (parte I)





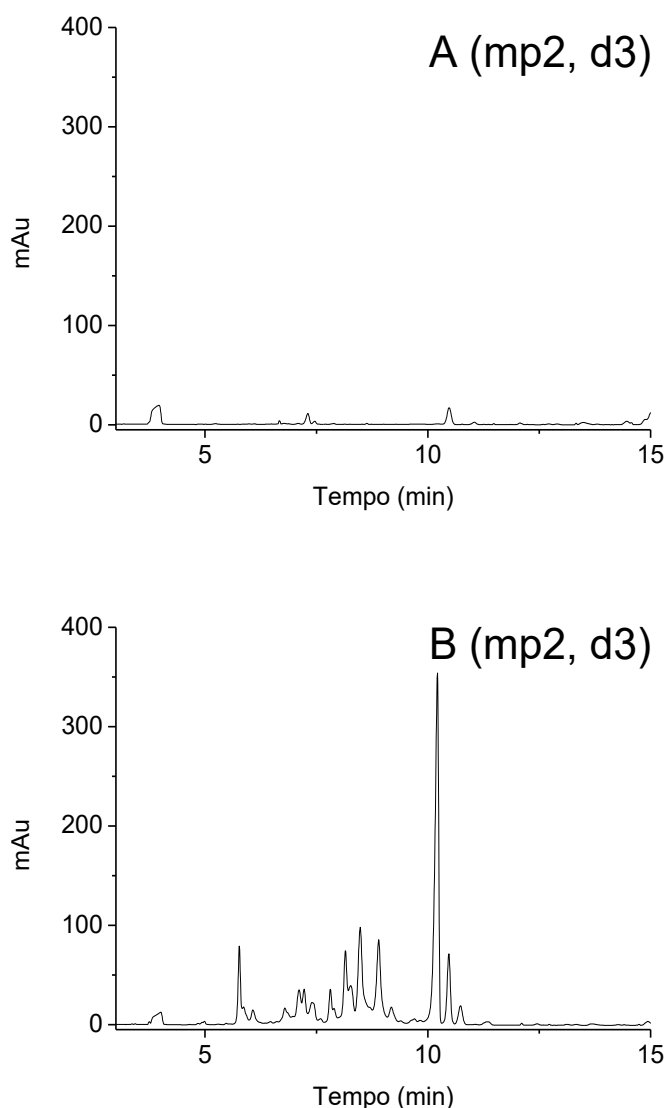


Legenda: eletroferograma (A) do branco da solução (mp1 e d1), (B) da mistura de 200,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM e PM (mp1 e d1), (C) do branco da solução (mp1, d2) e (D) da mistura de 200,0 mg L<sup>-1</sup>

de GM e PM (mp1 e d2). Condições: Eletrólito: 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 12,5% de MeOH, pH 9,4. Temperatura: 25 °C. Tensão: 15 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de 75  $\mu$ m d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 330 nm. Fonte: elaborado pelo autor.

O reagente mp2 foi derivatizado da seguinte maneira, 0,5 mL de água (ou padrão em solução aquosa), 0,5 mL de MeOH e 30  $\mu$ L do reagente (d3). Depois de agitar, essa mistura foi levada ao banho maria por 5 min a 40 °C (Figura 41) (KAALE et al., 2005). As condições de injeção são as mesmas dos testes anteriores, com exceção do comprimento de onda utilizado na detecção, 230 nm em vez de 330 nm, de acordo com o sugerido pelos autores.

**Figura 41.** Testes com diferentes modos de preparo e derivatização utilizando OPA (parte II)



Legenda: Eletroferograma (A) do branco da solução (mp2 e d3) e (B) da mistura de 200,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM e PM (mp2 e d3). Condições: Eletrólito: 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de

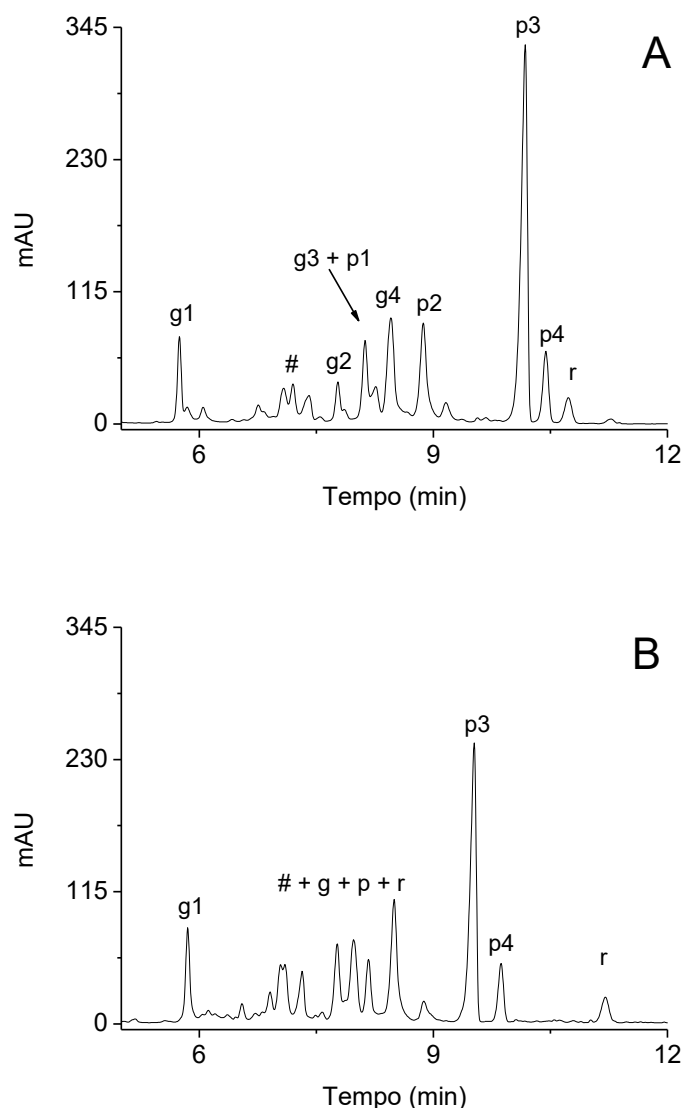
$\beta$ -CD e 12,5% de MeOH, pH 9,4. Temperatura: 25 °C. Tensão: 15 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de 75  $\mu$ m d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 230 nm. Fonte: elaborado pelo autor.

Após a análise desses resultados, verificou-se que a metodologia proposta por Kaale e colaboradores (2005) proporcionou melhores resultados, quando comparada com as outras metodologias, devido à maior estabilidade da linha de base, aumento do sinal analítico (em 230 nm) e melhor identificação dos picos da GM e PM.

As condições de separação testadas inicialmente foram baseadas no trabalho de Wienen e Holzgrabe (2002), no qual os autores descrevem um método de separação dos componentes da PM. Entretanto, mais esforços foram feitos, a fim de otimizar a separação entre os componentes da mistura de GM e PM (Quadro 11).

Os testes preliminares consistiram em avaliar os seguintes eletrólitos: (1) 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 12,5% de MeOH, pH 9,4. (2) 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 7,5 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 12,5% de MeOH, pH 9,4. (3) 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 7,5 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 14,5% de MeOH, pH 9,4. Com esses testes, foi possível comparar o efeito da concentração de  $\beta$ -CD em 3 mmol L<sup>-1</sup> e 7,5 mmol L<sup>-1</sup> e o efeito da concentração de MeOH no eletrólito (12,5 e 14,5 % (v/v)).

De acordo com a literatura, não apenas o tipo de ciclodextrina, mas a concentração delas tem efeito na separação de compostos (ST. PIERRE; SENTELL, 1994). O efeito da concentração de  $\beta$ -CD pode ser observado nos experimentos apresentados nas Figuras 42 A e B de modo que a menor concentração de  $\beta$ -CD (3 mmol L<sup>-1</sup>) no eletrólito de corrida proporcionou melhor resolução entre os picos. A relação entre o aumento da concentração de  $\beta$ -CD e a redução da resolução dos analitos pode ser devida à auto associação dos monômeros da  $\beta$ -CD em condições aquosas (ST. PIERRE; SENTELL, 1994).

**Figura 42.** Efeito da concentração de  $\beta$ -CD

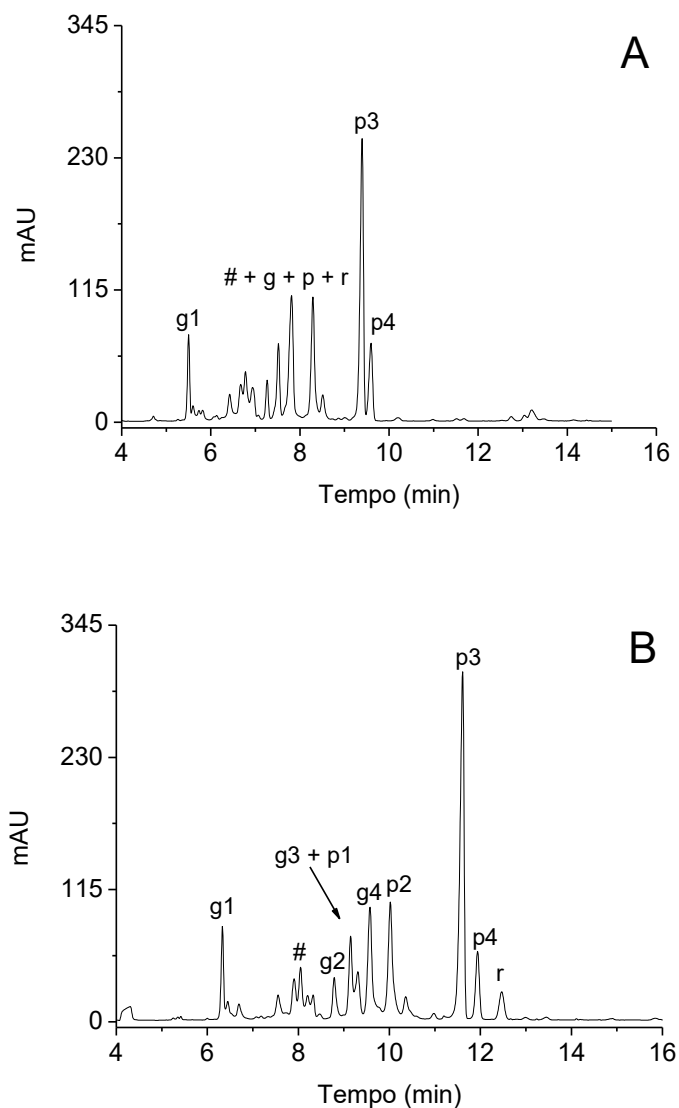
Legenda: eletroferograma da mistura de 200,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM e PM. Condições: Eletrólito (A) 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 12,5 % de MeOH, pH 9,4, (B) 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 7,5 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 12,5 % de MeOH, pH 9,4. Temperatura: 25 °C. Tensão: 15 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de 75  $\mu$ m d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 230 nm. Identificação dos picos: (g1), (g): gentamicina, (p) (p3) e (p4): paromomicina, (r): reagente, (#) desconhecido. Fonte: elaborado pelo autor.

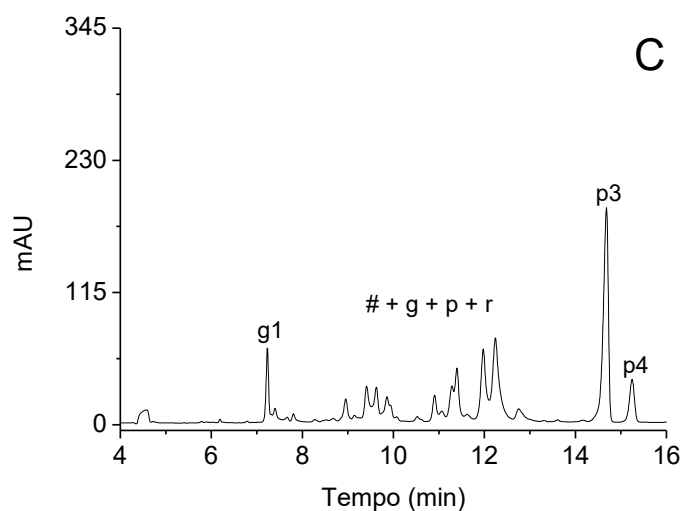
Ainda em relação aos efeitos da composição do eletrólito no sistema de separação, foi possível observar um aumento na resolução entre os picos g3 e p1 (de 0,85 para 0,97, respectivamente) quando a concentração de MeOH variou de 12,5 % para 14,5 % v/v. Portanto, o eletrólito contendo 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS, 3 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 14,5 % v/v de MeOH foi estabelecido para avaliar os seguintes parâmetros: efeito da concentração de TBS no sistema de separação (de 30 – 50 mmol L<sup>-1</sup>) (Figura 43), efeito da temperatura (21 – 25 °C) (Figura 44), efeito da tensão (14,5 – 16 kV)

(eletroferogramas não mostrados) e, novamente, o efeito da concentração de MeOH (14,5 – 16,5 % (v/v)).

Como já mencionado, a concentração de TBS no eletrólito altera diferentes parâmetros na separação, podendo causar mudança no EOF e aumento na resolução. Os resultados obtidos da avaliação da concentração de TBS (Figura 43) corroboram os resultados apresentados no trabalho de Wienen e Holzgrabe (2002). A melhor concentração de TBS foi 40 mmol L<sup>-1</sup>, pois apenas nessa condição foi possível visualizar os picos g3 e p1. Quando a concentração de TBS foi de 30 mmol L<sup>-1</sup>, o pico p1 da PM coeluiu com os componentes da GM. Utilizando a concentração de 50 mmol L<sup>-1</sup>, houve diminuição da magnitude do sinal analítico de todos os adutos, bem como um aumento da coeluição entre eles.

**Figura 43.** Efeito da concentração de TBS utilizando OPA

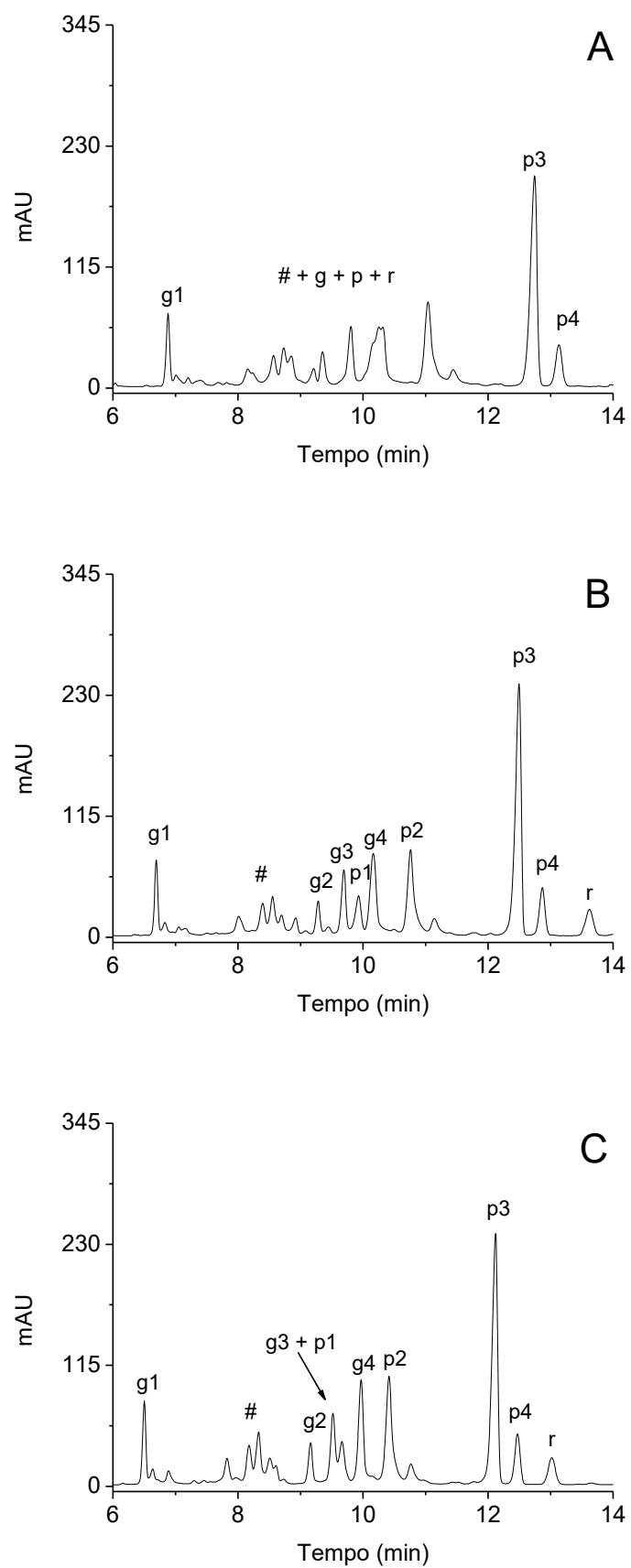




Legenda: eletroferograma da mistura de 200,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM e PM. Condições: Eletrólito (A) 30 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de β-CD e 14,5% de MeOH, pH 9,4, (B) 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de β-CD e 14,5% de MeOH, pH 9,4 (C) 50 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de β-CD e 14,5% de MeOH, pH 9,4. Temperatura: 25 °C. Tensão: 15 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de 75 μm d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 230 nm. Identificação dos picos: (g1) (g2) (g3) (g4): gentamicina, (p1) (p2) (p3) e (p4): paromomicina, (r): reagente, (#) desconhecido. Fonte: elaborado pelo autor.

Em todos os trabalhos publicados utilizando OPA, não foi descrita a influência da temperatura nos sistemas de separação dos AG investigados. No entanto, a temperatura pode modificar a mobilidade dos compostos, devido à alteração na viscosidade do eletrólito e/ou na constante dielétrica (BAKER, 1995; ALTRIA, 1996).

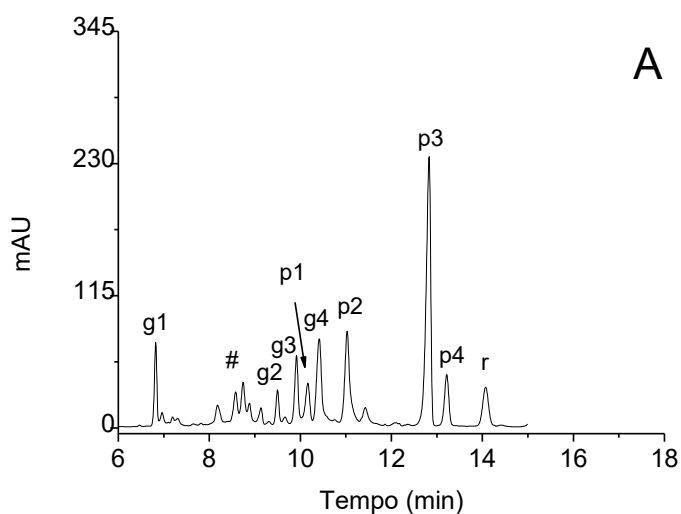
Foram testadas três diferentes temperaturas, 21, 23 e 25 °C (Figura 44). Os resultados mostraram que houve aumento na separação dos picos g3 e p1 quando a temperatura foi reduzida de 25 para 23 °C. Esse aumento na separação não foi visualizado em 21 °C, temperatura na qual os principais picos coeluíram. A temperatura de 23 °C foi, portanto, selecionada para os próximos testes.

**Figura 44.** Efeito da temperatura do cartucho utilizando OPA

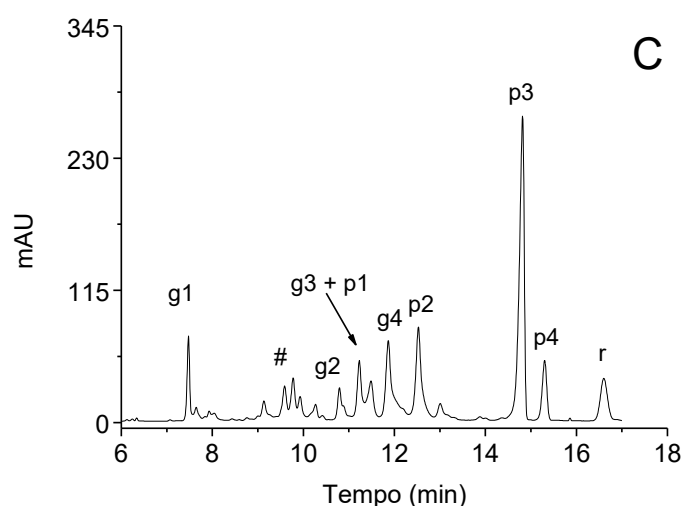
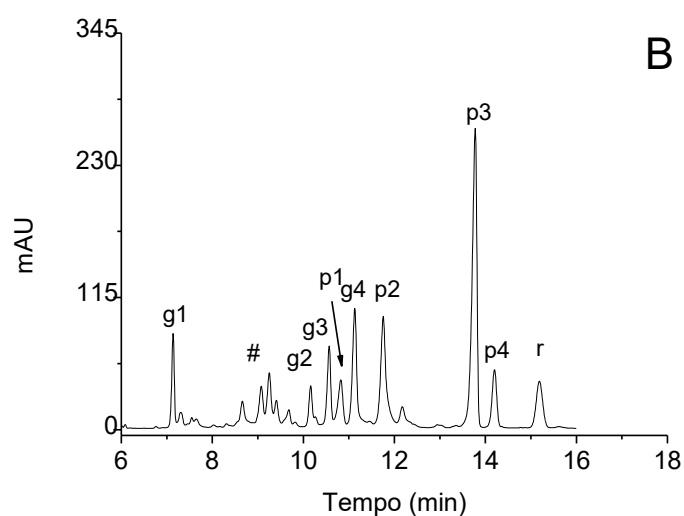
Legenda: eletroferograma da mistura de 200,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM e PM. Condições: Eletrólito 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 14,5 % de MeOH, pH 9,4. Temperatura: (A) 21 °C, (B) 23 °C e (C) 25 °C. Tensão: 15 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de 75  $\mu$ m d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 230 nm. Identificação dos picos: (g1) (g2) (g3) (g4): gentamicina, (p1) (p2) (p3) e (p4): paromomicina, (r): reagente, (#) desconhecido. Fonte: elaborado pelo autor.

Uma segunda avaliação na concentração de MeOH foi realizada, com o objetivo de melhorar a separação entre os picos g3, p1 e g4. Foi possível observar, com base nos resultados (Figura 45), que houve não apenas uma leve melhora na resolução dos analitos, quando a porcentagem de MeOH aumentou de 14,5 para 15,5 % v/v, mas também um aumento na magnitude do sinal analítico deles. No entanto, esse comportamento não foi observado para concentração superior a 15,5% (Figura 45 C, 16,5 % v/v de MEOH). A condição otimizada foi de 15,5% v/v de MeOH no eletrólito.

**Figura 45.** Efeito da concentração de MeOH no eletrólito utilizando OPA







Legenda: Eletroferograma da mistura de 200,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM e PM. Condições: Eletrólito (A) 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de β-CD e 14,5% de MeOH, pH 9,4 (B) 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de β-CD e 15,5% de MeOH, pH 9,4 (C) 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de β-CD e 16,5% de MeOH, pH 9,4 Temperatura: 23 °C. Tensão: 15 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de 75 μm d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 230 nm. Identificação dos picos: (g1) (g2) (g3) (g4): gentamicina, (p1) (p2) (p3) e (p4): paromomicina, (r): reagente, (#) desconhecido. Fonte: elaborado pelo autor.

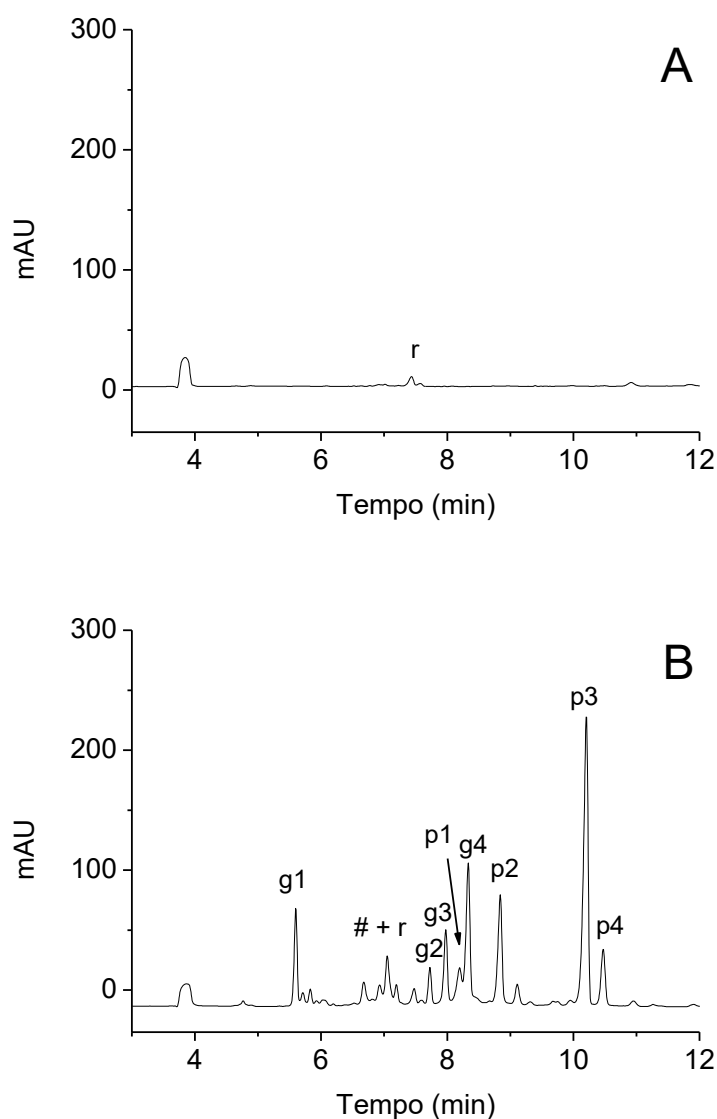
Após a otimização das condições analíticas e instrumentais foram feitos testes de repetibilidade, para verificar a estabilidade da reação de derivatização e foi constatado que, em algumas corridas, houve a coeluição entre os picos críticos (g3, p1 e g4). Para resolver esse problema, foi realizado mais um experimento, variando o valor de pH do eletrólito de 9,4 para 9,0. No valor de pH 9,0, os picos críticos apresentaram melhora na separação e menor variação no tempo de migração dos

analitos (resultados não mostrados). Por essa razão, para os experimentos subsequentes, o pH do eletrólito foi ajustado para o valor de 9,0.

Depois da mudança no valor de pH, foi observado um aumento no tempo de migração dos analitos, comportamento já esperado, uma vez que a redução no valor do pH também reduz o EOF (ALTRIA, 1996). Por essa razão, foi feito um ajuste na tensão (para 16 kV) para manter o compromisso entre resolução e tempo de análise.

Verificou-se que, após utilizar a derivatização proposta por Kaale e colaboradores (2005) e otimizar as condições analíticas inicialmente descritas por Wiene e Holzgrabe (2003), foi possível obter a separação entre os principais picos da GM (g1, g2, g3 e g4) e PM (p2, p3 e p4) (Figura 46).

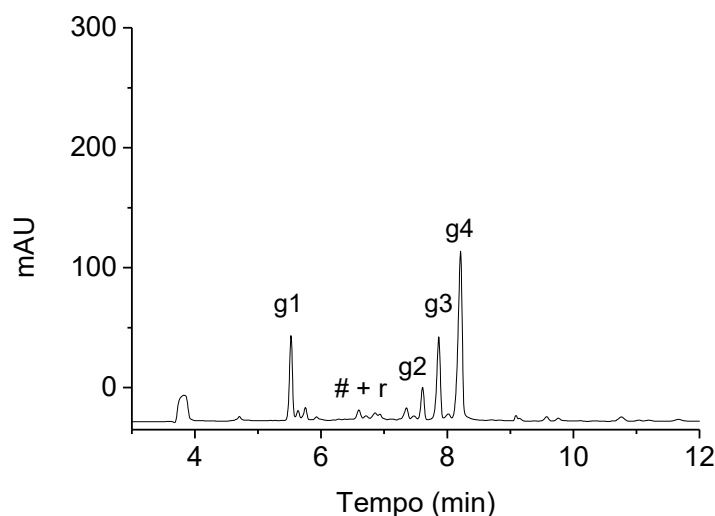
**Figura 46.** Condições otimizadas utilizando OPA



Legenda: eletroferograma (A) do branco da solução (B) do padrão de 250,0 mg L<sup>-1</sup> da mistura de sulfato de GM e PM. Condições: Eletrólito 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de β-CD e 15,5% de MeOH, pH 9,0. Temperatura: 23 °C. Tensão: 16 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de 75 μm d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 230 nm. Identificação dos picos: (g1) (g2) (g3) (g4): gentamicina, (p1) (p2) (p3) e (p4): paromomicina, (r): reagente, (#) desconhecido. Fonte: elaborado pelo autor.

Conforme já mencionado, segundo a literatura, a GM é constituída por cinco componentes majoritários (C1, C1a, C2, C2a e C2b) e algumas impurezas. A Farmacopeia Europeia (Ph. Eur) recomenda limites na composição de 20 - 40% de C1, 10 - 30% de C1a, de 40 - 60% na soma de C2, C2a e C2b da concentração total de GM. Em relação às impurezas, é recomendado um máximo de 3% de qualquer composto ou 10% da soma total (COUNCIL OF EUROPE, 2004). Três são as impurezas específicas produzidas durante a síntese de GM (sisomicina, *garamine* e gentamicina B<sub>1</sub>) e duas podem ser detectadas em algumas amostras (impureza D e 2-desoxistreptamina). Essas impurezas são conhecidas também por A, B, C, D e E, respectivamente. A Figura 47 mostra o padrão individual da GM.

Devido à indisponibilidade dos padrões individuais de GM, não foi possível a confirmação exata de cada componente, no entanto, a ordem de eluição obtida por Kaale e colaboradores (2001), para os principais componentes da GM foi C1, C2a, C1a e C2. Portanto, ao comparar essa ordem com a Figura 47 (padrão de 250,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM), verifica-se que os picos g1, g2, g3 e g4 são os mais significativos em termos de concentração e podem estar relacionados com os componentes anteriormente citados (g1= C1, g2=C2a, g3=C1a, g4=C2).

**Figura 47.** Padrão individual de 250,0 mg L<sup>-1</sup> de GM

Legenda: eletroferograma do padrão de 250,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM. Condições: Eletrólito 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 15,5% de MeOH, pH 9,0. Temperatura: 23 °C. Tensão: 16 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de 75  $\mu$ m d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 230 nm. Identificação dos picos: (g1) (g2) (g3) (g4): gentamicina, (r): reagente, (#) desconhecido. Fonte: elaborado pelo autor.

A PM não é regulamentada pela USP e pela Ph. Eur, porém, é considerada uma mistura de dois isômeros, paromomicina I (ou neomicina E) e paromomicina II (Neomicina F) e normalmente se encontram no padrão de PM em 95% e até 5%, respectivamente (STYPULKOWSKA et al., 2013; HOLZGRABE; SCHMITT; WIENEN, 2016).

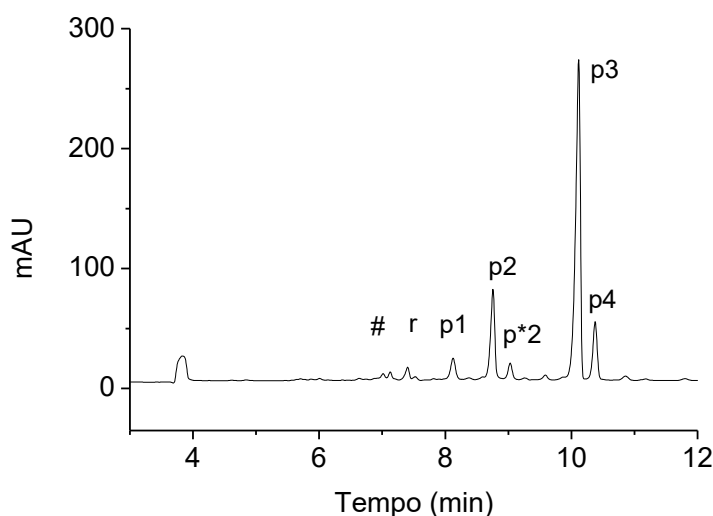
Pastore e colaboradores (2000) utilizaram HPLC, acoplada com detecção amperométrica pulsada, para analisar PM em alimentação de animais e obtiveram a separação da PM em PM I e PM II. Já Liu e colaboradores (2010) separaram a PM I de outras três impurezas desconhecidas, por HPLC acoplada com detector evaporativo de espalhamento de luz. Outro teste realizado por esses autores foi com a neomicina A, para verificar se esse composto era uma das impurezas desconhecidas, mas tal possibilidade foi descartada.

No método proposto por Wienen e Holzgrabe (2002), utilizando CE-DAD e OPA como agente derivatizante para análise de PM, foi observada a presença de 6 picos (a,b,x,c,d,e) no eletroferograma da amostra padrão. Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos observados por Wienen e Holzgrabe (2002). Na análise

do padrão de 250,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de PM, pode ser observada a presença de 5 principais picos (p1, p2, p\*2, p3 e p4) (Figura 48).

Devido à falta de informação na literatura, ainda não se sabe a identificação exata de cada componente da PM, utilizando o método do OPA. Apesar disso, é possível inferir, pela concentração e pelo tempo de migração, que o pico p3 seja paromomicina I e que o pico p4 seja a Paromomicina II.

**Figura 48.** Padrão individual de 250,0 mg L<sup>-1</sup> de PM



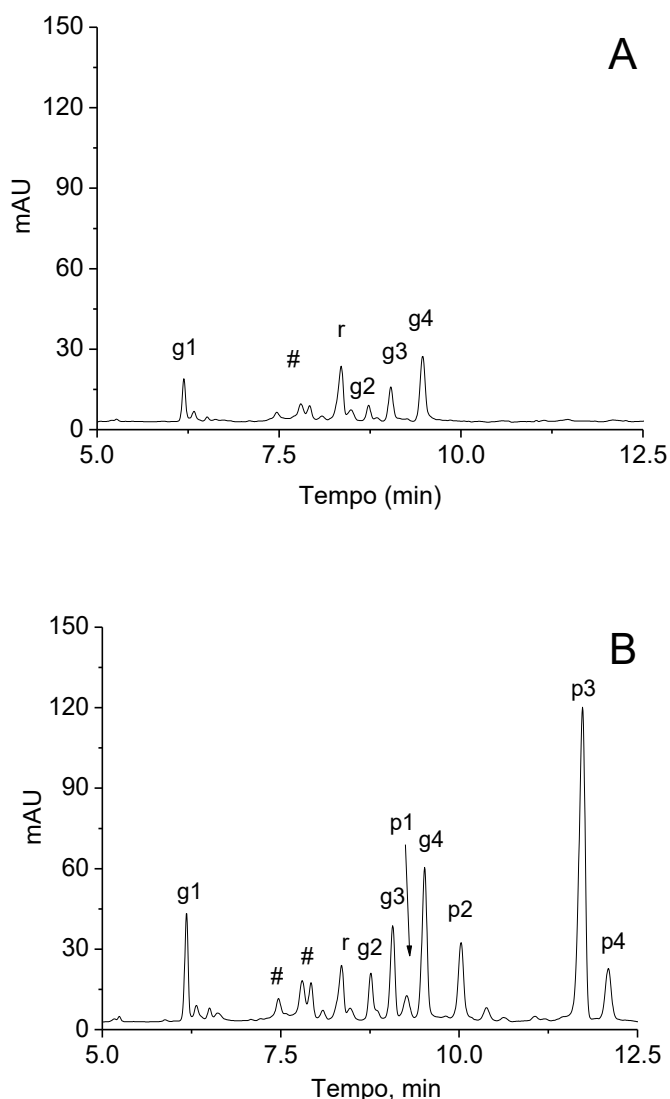
Legenda: eletroferograma do padrão de 250,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de PM. Eletrólito 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 15,5% de MeOH, pH 9,0. Temperatura: 23 °C. Tensão: 16 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de 75  $\mu$ m d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 230 nm. Identificação dos picos: (p1) (p2) (p2\*) (p3) e (p4): paromomicina, (r): reagente, (#) desconhecido. Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.6.1. Validação do método

##### 4.1.6.1.1. Seletividade, LOD, LOQ e linearidade

A seletividade foi demonstrada em amostras comerciais de GM, nos quais foram adicionados 60,0 mg L<sup>-1</sup> da mistura padrão de GM e PM (base) (Figura 49).

**Figura 49.** Amostra comercial e amostra comercial fortificada com 60,0 mg L<sup>-1</sup> de GM e PM.



Legenda: eletroferograma (A) da amostra comercial de GM 25,0 mg L<sup>-1</sup> base e (B) da amostra fortificada com 60,0 mg L<sup>-1</sup> da mistura de GM e PM base. Eletrólito: 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -CD e 15,5% de MeOH, pH 9,0. Temperatura: 23 °C. Tensão: 16 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de 75  $\mu$ m d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 230 nm. Identificação dos picos: (g1) (g2) (g3) (g4): gentamicina, (p1) (p2) (p2\*) (p3) e (p4): paromomicina, (r): reagente, (#) desconhecido. Fonte: elaborado pelo autor.

A curva analítica foi construída no intervalo de 33,75 – 135,0 mg L<sup>-1</sup> para PM e 44,26 – 88,24 mg L<sup>-1</sup> para a GM (as concentrações estão na forma de base). Os menores valores de LOD e LOQ obtidos foram para p3 e os maiores valores encontrados foram para p1 (Tabela 1). O método se mostrou linear dentro dos valores de concentração avaliados para a soma da GM e PM ( $r > 0,99$ ). Além disso, todos os componentes individuais tiveram o coeficiente de correlação com  $r > 0,978$ .

**Tabela 1.** Parâmetros obtidos da curva analítica dos AG utilizando o método do OPA

<i>Analito</i>	<i>Curva analítica</i>			
	<i>equação da reta</i>	<i>r.</i>	<i>LOD<sup>#</sup></i> <i>(mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>LOQ<sup>##</sup></i> <i>(mg L<sup>-1</sup>)</i>
G <sub>1</sub>	Y = 2,076x - 48,8	0,9994	10,0	50,0
G <sub>2</sub>	Y = 0,894x - 22,6	0,9844	22,5	75,0
G <sub>3</sub>	Y = 2,28x - 31,5	0,9939	13,6	45,5
G <sub>4</sub>	Y = 4,21x - 73,5	0,9952	5,1	17,0
Soma GM	Y = 9,46x - 176	0,9969	-	-
P <sub>1</sub>	Y = 1,49x - 35,6	0,9781	25,3	84,4
P <sub>2</sub>	Y = 6,12x - 63,4	0,9987	7,2	24,1
P <sub>3</sub> <sup>a</sup>	Y = 16,7x + 78,01	0,9962	1,9	6,4
P <sub>4</sub>	Y = 2,94x + 5,85	0,9983	12,2	40,5
Soma PM	Y = 26,4x + 64,5	0,9986	-	-

Legenda: <sup>a</sup> intervalo da concentração: 3,4 – 135,0 mg L<sup>-1</sup>; # S/N= 3; ## S/N =10 Onde S: sinal e N= ruído.

Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.6.1.2. Precisão

Os valores referentes ao coeficiente de variação, obtidos no teste de repetibilidade, variaram no intervalo de 0,1 - 7,9 % e no teste de precisão intermediária de 3,7 - 15,5 % (Tabela 2). Esses valores são similares aos valores de precisão encontrados por Kaale e colaboradores (2005), que separaram e quantificaram a GM por CE-DAD utilizando OPA.

**Tabela 2.** Resultados de precisão utilizando o método do OPA.

Analito	30,0 (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>		70,0 (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>		120,0 (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	
	Rep <sup>#</sup> (%)	Precisão int <sup>##</sup> (%)	Rep <sup>#</sup> (%)	Precisão int <sup>##</sup> (%)	Rep <sup>#</sup> (%)	Precisão int <sup>##</sup> (%)
G <sub>1</sub>	5,5	6,0	2,1	12,4	1,1	5,7
G <sub>2</sub>	7,9	9,5	1,5	14,5	0,6	6,8
G <sub>3</sub>	6,4	8,6	1,9	11,7	0,1	3,7
G <sub>4</sub>	4,8	8,1	0,9	10,9	2,8	4,2
P <sub>1</sub>	1,8	15,5	0,3	10,9	0,4	7,0
P <sub>2</sub>	1,6	10,5	2,4	8,3	0,5	4,4
P <sub>3</sub>	1,7	7,7	0,2	13,4	2,6	4,1
P <sub>4</sub>	0,5	7,1	0,4	11,2	3,3	6,0

Onde: <sup>a</sup> concentração da base. # Repetibilidade n= 3 e ## Precisão intermediária n=9. Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.1.6.1.3. Recuperação

Os valores de recuperação obtidos variaram no intervalo de 76,2 - 108,7 % (Tabela 3). Para os componentes g<sub>3</sub> e g<sub>4</sub> da GM, na concentração de 30,0 mg L<sup>-1</sup> os valores estão abaixo do esperado para análises de matrizes com baixa complexidade, como é o caso dos fármacos, entretanto, de acordo com a literatura, a variação entre 80 - 110% é aceitável para a faixa de concentração avaliada neste trabalho (HUBER, 2007). Para as concentrações de 60,0 e 90,0 mg L<sup>-1</sup> a recuperação variou no intervalo de 90,1 até 106,7%. Esses resultados são satisfatórios para testes de recuperação, dessa forma, na fase de aplicação, as amostras comerciais foram diluídas para valores de concentração de 44,3 mg L<sup>-1</sup> na forma de base.



**Tabela 3.** Resultados de recuperação utilizando o método do OPA.

<i>Analito</i>	<i>30,0 (mg L<sup>-1</sup>)<sup>a</sup></i>	<i>60,0 (mg L<sup>-1</sup>)<sup>a</sup></i>	<i>90,0 (mg L<sup>-1</sup>)<sup>a</sup></i>
	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Recuperação (%)</i>
G <sub>1</sub>	96,4	99,1	98,0
G <sub>2</sub>	103,0	90,1	94,5
G <sub>3</sub>	82,9	94,8	92,6
G <sub>4</sub>	76,2	90,8	89,2
Soma GM	84,5	93,5	92,5
P <sub>1</sub>	108,7	106,9	106,7
P <sub>2</sub>	104,5	102,2	105,9
P <sub>3</sub>	85,4	102,2	94,0
P <sub>4</sub>	86,9	103,8	96,9
Soma PM	89,2	103,2	97,2

<sup>a</sup> concentração da base; Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.1.6.1.4. Aplicação

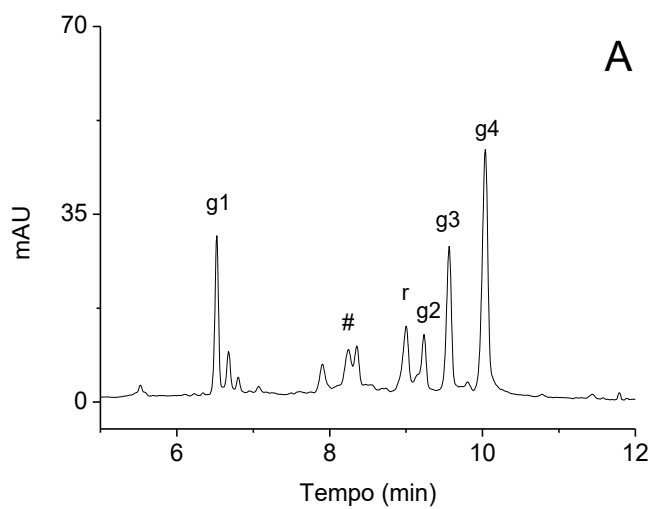
Esse método foi aplicado em dois momentos distintos. O primeiro consistiu em quantificar amostras comerciais de fármacos contendo GM em sua composição (não foram realizados testes em amostras comerciais de PM, pois, no Brasil, a utilização desse fármaco ainda não é regulamentada) (Figura 50). A segunda aplicação foi realizada em um sistema simulado de liberação controlada, utilizando uma membrana de diálise e uma amostra comercial de GM fortificada com PM para construção do perfil de liberação (item 3.3.1.6.1).

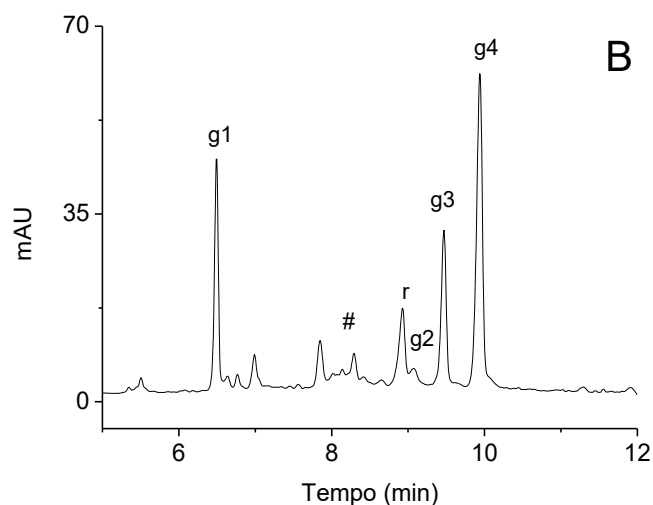
Os resultados da aplicação do método em amostras comerciais (Tabela 4) sugerem resultados similares aos obtidos com o método na ninidrina. Também foi possível observar a diferença na porcentagem de cada componente da GM nas amostras comerciais.

**Tabela 4.** Concentração de GM base nas amostras comerciais (mg mL<sup>-1</sup>) - média ± DP

Amostras	Método CE utilizando OPA					Método padrão (MEN)	Valor declarado
	G1 (%)	G2 (%)	G3 (%)	G4 (%)	GM Total (mg mL <sup>-1</sup> )	GM Total (mg mL <sup>-1</sup> )	GM Total (mg mL <sup>-1</sup> )
Colírio A	36,8	3,1	12,7	47,4	3,3 ± 0,10	3,0 ± 0,16	3,0
Colírio B	23,1	1,5	21,3	54,2	3,5 ± 0,15	2,7 ± 0,21	3,0
Suspensão otológica	27,3	2,4	25,0	45,3	2,7 ± 0,12	2,4 ± 0,14	2,7
Ampola	17,3	8,1	24,7	49,9	41,7 ± 1,8	38,6 ± 2,7	40,0
padrão de GM em água <sup>#</sup>	18,2	10,8	26,9	44,1	-	-	-

Legenda: MEN: método espectrofotométrico com ninidrina. Fonte: elaborado pelo autor

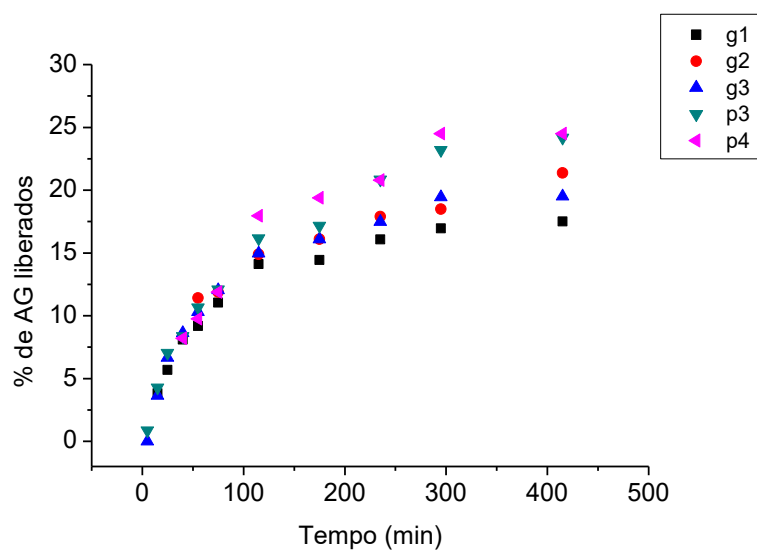
**Figura 50.** Comparação dos eletroferogramas de duas amostras diferentes



Legenda: eletroferogramas das amostras farmacêuticas (A) ampola (B) colírio B na concentração de  $44,2 \text{ mg L}^{-1}$  base. Eletrólito:  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de TBS contendo  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\beta$ -CD e 15,5% de MeOH, pH 9,0. Temperatura:  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tensão: 16 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de  $75 \text{ }\mu\text{m}$  d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 230 nm. Identificação dos picos: (g1) (g2) (g3) (g4): gentamicina, (r): reagente, (#) desconhecido. Fonte: elaborado pelo autor.

Quando comparados, o método do OPA não se diferenciou significativamente do método da ninidrina, de acordo com o teste T. O valor de  $T_{\text{tabelado}}$  para três graus de liberdade foi de 3,182 ( $\alpha = 0,05$ ), o valor do  $T_{\text{calculado}}$  foi de 1,630 ( $p$  bilateral = 0,201), portanto pode-se afirmar, com 95% de confiança, que não existe diferença entre os métodos. O mesmo é observado quando comparou-se o método do OPA com os valores descritos nas embalagens ( $T_{\text{calculado}} = 1,703$  com  $p$  Bilateral = 0,187).

Com base na segunda aplicação, foi possível criar um perfil de liberação de GM e PM (Figura 51). Constatou-se que o método desenvolvido neste trabalho foi capaz de quantificar a liberação em SLC contendo GM e PM.

**Figura 51.** Perfil de liberação GM e PM em função do tempo.

Legenda: Gráfico do perfil de liberação da mistura padrão de GM e PM utilizando o método OPA. Membrana de diálise (12000 – 16000 Da) com 4 cm x 3,2 cm. A membrana foi a 37 °C em banho maria. Identificação: (g1), (g2), (g3): Gentamicina (P3), (P4): Paromomicina. Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.7. Desenvolvimento do método com detecção indireta

No trabalho de Ackermans e colaboradores (1992), diferentes experimentos foram feitos utilizando a detecção indireta, porém, os autores não conseguiram resultados satisfatórios na separação dos AG em FSCE, utilizando imidazol como eletrólito de corrida em modo catiônico, devido ao formato irregular de seus picos. A justificativa que esses autores encontraram para o comportamento observado foi que essa irregularidade era causada devido à força de atração entre os grupos  $\text{NH}^+$  presentes nos AG (carregados positivamente em pH de 3 - 8) e os grupos silanóis presentes na parede do capilar. Por esse motivo, adicionaram ao eletrólito de corrida um inversor de fluxo denominado FC 135 e a separação foi feita no modo aniônico, utilizando como eletrólito de corrida uma mistura de imidazol e FC 135, pH 5,0. Os AG avaliados neste trabalho foram a AM, TM, dihidrostreptomomicina, lividomicina, canamicina e sisomicina.

Outras composições de eletrólito, comumente utilizadas para a análise de cátions, não foram exploradas nos trabalhos descritos na literatura. Nesse sentido, buscando a possibilidade de desenvolver um método mais simples utilizando imidazol como eletrólito de corrida com detecção indireta, foram avaliadas diferentes condições analíticas e instrumentais apresentadas no Quadro 12. Para o desenvolvimento e validação desse método, foram utilizadas, além de GM e PM, a AM. A escolha da utilização da AM foi feita para evidenciar a utilização desse método para a separação de outros AG e servir como um potencial padrão interno.

**Quadro 12.** Condições analíticas e instrumentais avaliadas para o método de detecção indireta

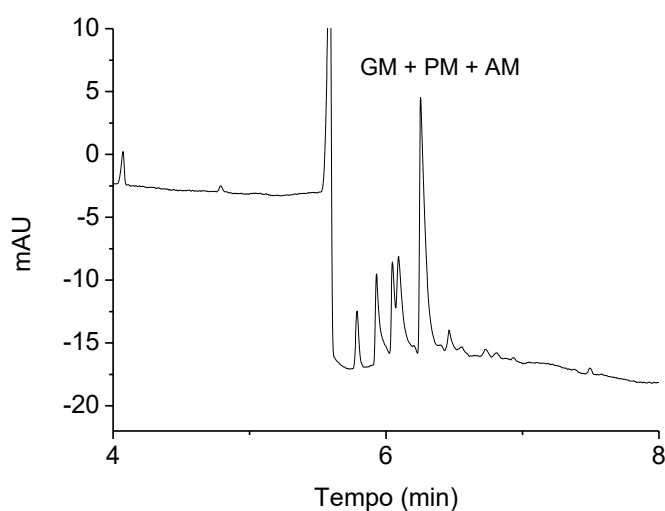
<i>Otimização da separação dos aminoglicosídeos</i>			
<i>Variável</i>	<i>Intervalo do teste</i>	<i>Condição otimizada</i>	<i>Figura</i>
[Imidazol] (mmol L <sup>-1</sup> )	30 – 50	30	-
[éter-coroa] (mmol L <sup>-1</sup> )	0 – 10	10	-
pH	2,5 - 6,5	2,5	Figura 55
MeOH (%)	0 – 10	-	-
ACN (%)	0 – 10	-	-
[β-ciclodextrina] (mmol L <sup>-1</sup> )	0 – 15	-	-
Temperatura (°C)	27 – 31	29	-
Tempo de injeção (30 mbar x s)	4 – 10	7	-
Tensão (kV)	9 – 13	11	-
Condições otimizadas	-	-	Figura 61

Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.7.1. Condições Iniciais

A utilização de imidazol como eletrólito de corrida para a determinação de amins e cátions inorgânicos já está bem estabelecida na literatura e, quando a seletividade da separação é requerida, uma variedade de aditivos como ácidos orgânicos (ácido 2-hidroxi-butírico, lactato etc.) e agentes complexante (éter-coroa) pode ser adicionada ao eletrólito de corrida (PEREIRA; TAVARES, 2004). Para os testes iniciais, um eletrólito contendo 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol, 10 mmol L<sup>-1</sup> de ácido 2-hidroxi-butírico (HIBA) e 5 mmol L<sup>-1</sup> de éter-coroa, pH 5 foi selecionado. Essas condições foram modificadas a partir de dados presentes na literatura (HE et al., 2017; VORTMANN-WESTHOVEN et al., 2017) (Figura 52).

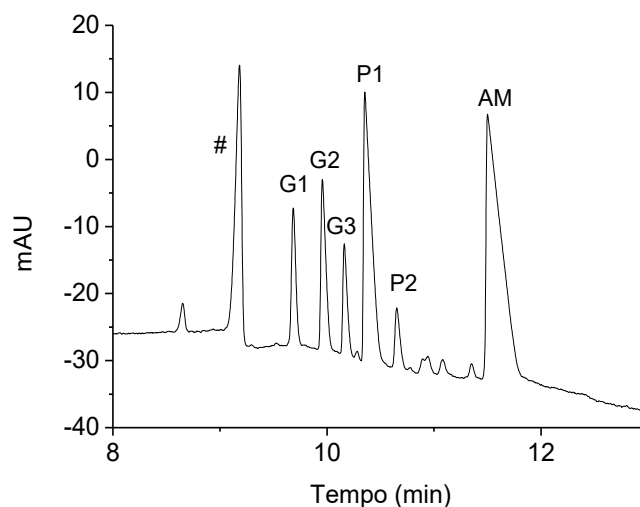
**Figura 52.** Condições iniciais utilizando imidazol



Legenda: eletroferograma da mistura de 200,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM, PM e AM. Condições: Eletrólito contendo 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol, 10 mmol L<sup>-1</sup> de ácido 2-hidroxi-butírico e 5 mmol L<sup>-1</sup> de éter-coroa, pH 5,0, temperatura de 29 °C, tensão de 15 kV, injeção de 30 mbar x 7 s e capilar de 75 µm d.i x 58,5 cm de comprimento total (50 cm de comprimento efetivo) e detecção em referência:400/ sinal 214 nm. Fonte: elaborado pelo autor. (PM) paromomicina, (GM) gentamicina, (AM) amicacina.

Com base em uma série de experimentos preliminares (não mostrados), variando as condições analíticas (concentração, composição e pH do eletrólito) e instrumentais (tensão e tempo de injeção), foi estabelecida uma condição para dar início ao processo de otimização do sistema de separação (Figura 53).

**Figura 53.** Eletroferograma da condição selecionada para início da otimização de separação

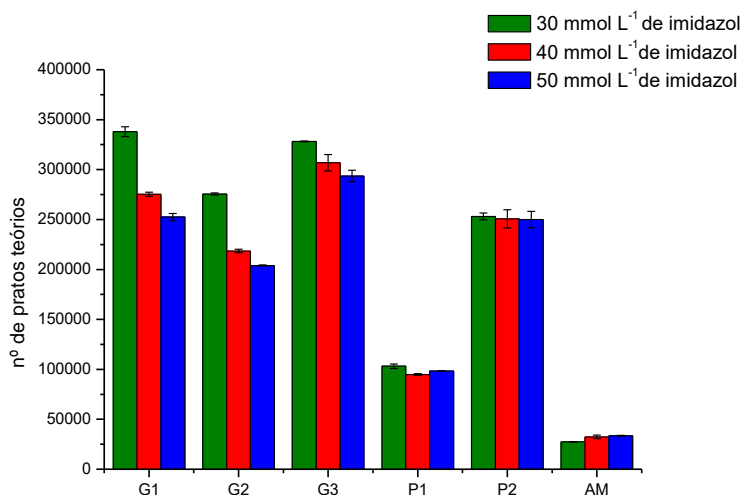


Legenda: eletroferograma da mistura de 200,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM, PM e A. Condições: Eletrólito contendo 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol, pH 2,5, temperatura de 29 °C, tensão de 11 kV, injeção de 30 mbar x 10 s e capilar de 75 µm d.i x 58,5 cm de comprimento total (50 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400:214 nm. Identificação dos picos: (G1), (G2), (G3): gentamicina, (P1) e (P2): paromomicina, (AM): amicacina, (#) desconhecido. Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.7.2. Efeito da Concentração de Imidazol no Eletrólito

O efeito da variação da concentração do imidazol (30 – 50 mmol L<sup>-1</sup>) foi avaliado com as demais condições fixas. De acordo com a Figura 54, é possível observar um aumento na eficiência de todos os picos da GM e PM, com a diminuição da concentração de 50 mmol L<sup>-1</sup> para 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol. Já para AM, foi observado um comportamento inverso e o melhor valor de eficiência foi observado utilizando a concentração de 50 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol. Uma vez que o objetivo desse método foi separar e quantificar prioritariamente os componentes da GM e PM, foi selecionada a concentração de 30 mmol L<sup>-1</sup> para os próximos testes.

**Figura 54.** Efeito da concentração de imidazol no eletrólito na eficiência dos picos



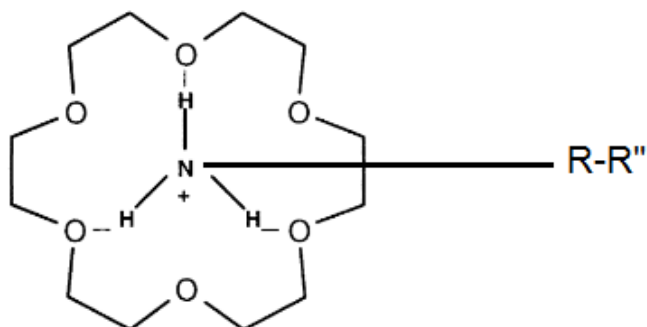
Legenda: (G1) (G2) (G3): gentamicina; (P1) e (P2): paromomicina; (AM): amicacina. Condições: Eletrólito contendo 30 - 50 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol, pH 2,5, temperatura de 29 °C, tensão de 11 kV, injeção de 30 mbar x 10 s e capilar de 75 µm d.i x 58,5 cm de comprimento total (50 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400 : 214 nm. Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.7.3. Efeito da Adição de Aditivos no Eletrólito

A utilização de agentes complexantes, tais como o éter-coroa é bem conhecida na literatura para a separação de aminas primárias (JAGER; TAVARES, 2001) e também vem sendo aplicada na separação de enantiômeros de importância farmacêutica (MOHAMMADZADEH KAKHKI; ASSADI, 2014). O éter-coroa é um seletor quiral no qual a separação ocorre por meio da formação de um complexo de inclusão do grupo NH<sub>3</sub><sup>+</sup> do soluto com o éter-coroa. A extensão com que esse reconhecimento ocorre depende da interação secundária dos substituintes do éter-coroa com os grupos funcionais do analito (Figura 55) (ALTRIA, 1998). Sendo assim, se os complexos formados possuírem diferentes mobilidades em relação aos solutos livres, ocorre uma diferenciação no tempo de migração, tornando possível a separação de diferentes analitos (ALTRIA, 1996).



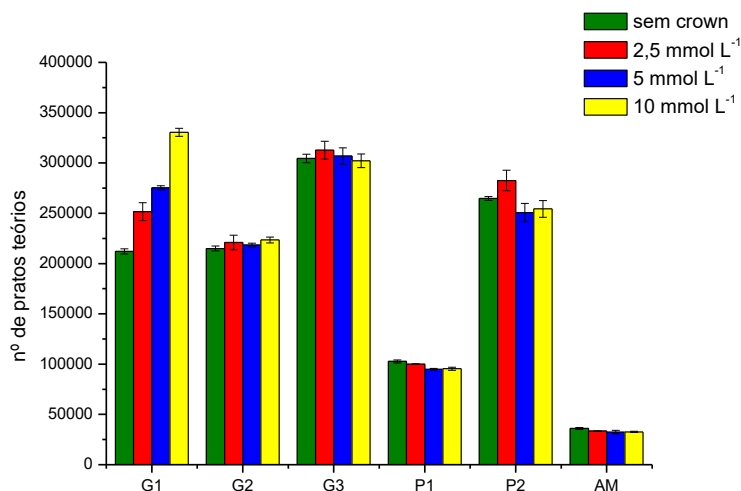
**Figura 55.** Estrutura do complexo de inclusão amina/éter-coroa



Legenda: R e R'': grupos funcionais ligados a amina. Adaptado de ALTRIA, (1998)

A concentração do éter-coroa adicionada ao eletrólito de corrida variou de 0 - 10 mmol L<sup>-1</sup>. O aumento da concentração de éter-coroa proporcionou melhor eficiência do pico G1 (Figura 56). Outro fato observado, foi o aumento da resolução entre os picos da G3 e P1 ( $r=1,62$  sem de éter-coroa,  $r=1,91$  com 10 mmol L<sup>-1</sup> de éter-coroa adicionado ao eletrólito). Apesar de o éter-coroa apresentar resultados satisfatórios em relação à eficiência para o G1 e resolução entre G3 e P1, optou-se por não utilizá-lo no eletrólito de corrida, já que não foram observadas variações significativas na eficiência dos demais picos (Figura 56). Se o aditivo não proporciona um efeito significativo na resolução e/ou na eficiência dos picos, não existe motivo para tornar a composição do eletrólito mais complexa, pois o ideal é utilizar um eletrólito simples, de baixo custo e capaz de separar os analitos de interesse.

**Figura 56.** Efeito da presença e concentração de éter-coroa na eficiência dos componentes da GM, PM e AM



Legenda: (G1) (G2) e (G3): gentamicina; (P1) e (P2): paromomicina; (AM): amicacina. Condições: Eletrólito contendo 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol e 0-10 mmol L<sup>-1</sup> éter-coroa, pH 2,5, temperatura de 29 °C, tensão de 11 kV, injeção de 30 mbar x 10 s e capilar de 75 µm d.i x 58,5 cm de comprimento total (50 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400:214 nm. Fonte: elaborado pelo autor.

Outro aditivo avaliado foi a  $\beta$ -CD. Assim como o éter-coroa, essa molécula se comporta como uma pseudofase, na qual o analito pode inserir-se em sua cavidade. Esse fenômeno é o responsável pela mudança na partição do analito entre a  $\beta$ -ciclodextrina e a fase aquosa (BAKER, 1995). Em FSCE, o EOF é quase que inexistente quando o valor do pH do eletrólito é inferior a 3, portanto, os compostos quando estão dentro da  $\beta$ -ciclodextrina não migram, uma vez que ela não possui carga e, quando esses solutos estão livres na solução, migram de acordo com a sua mobilidade eletroforética.

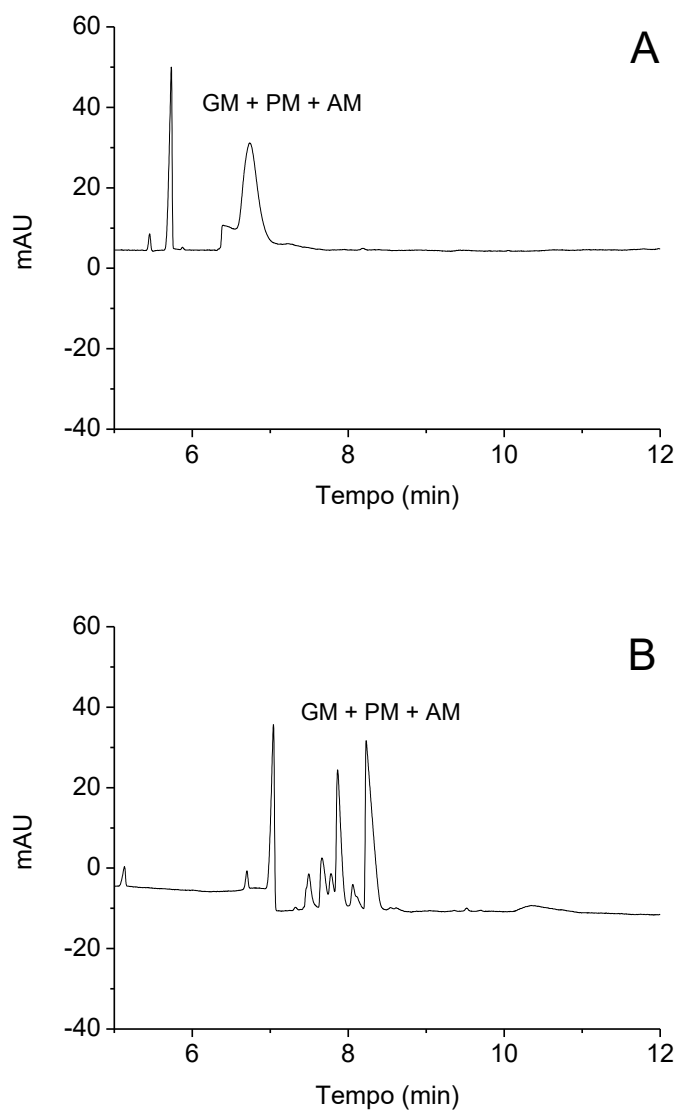
Os resultados não mostraram diferenças no sistema de separação dos AG quando  $\beta$ -CD 15 mmol L<sup>-1</sup> foi adicionada ao eletrólito de corrida (resultados não mostrados).

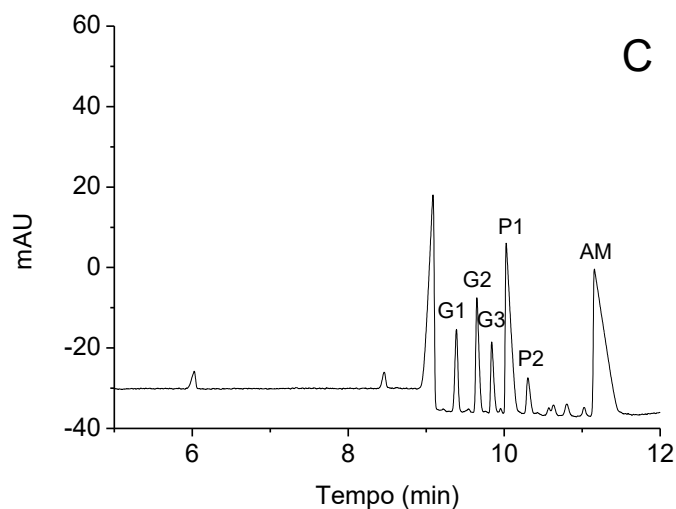
#### 4.1.7.4. Efeito do pH no eletrólito

Para avaliar o efeito do pH no sistema de separação, foram selecionados os pHs de 2,5; 5,5 e 6,5. A melhor separação foi obtida em pH 2,5 (Figura 57 C). Esse

fenômeno pode ser explicado devido ao efeito que o pH causa na ionização e, conseqüentemente, na mobilidade eletroforética dos solutos como também no EOF, já que uma redução no valor do pH pode diminuir a dissociação dos grupos Si-OH em Si-O<sup>-</sup> presentes na parede do capilar e, conseqüentemente, eliminar o EOF. As mudanças desses parâmetros afetaram substancialmente a seletividade dos componentes (Figura 57).

**Figura 57.** Efeito do pH no sistema de separação utilizando imidazol



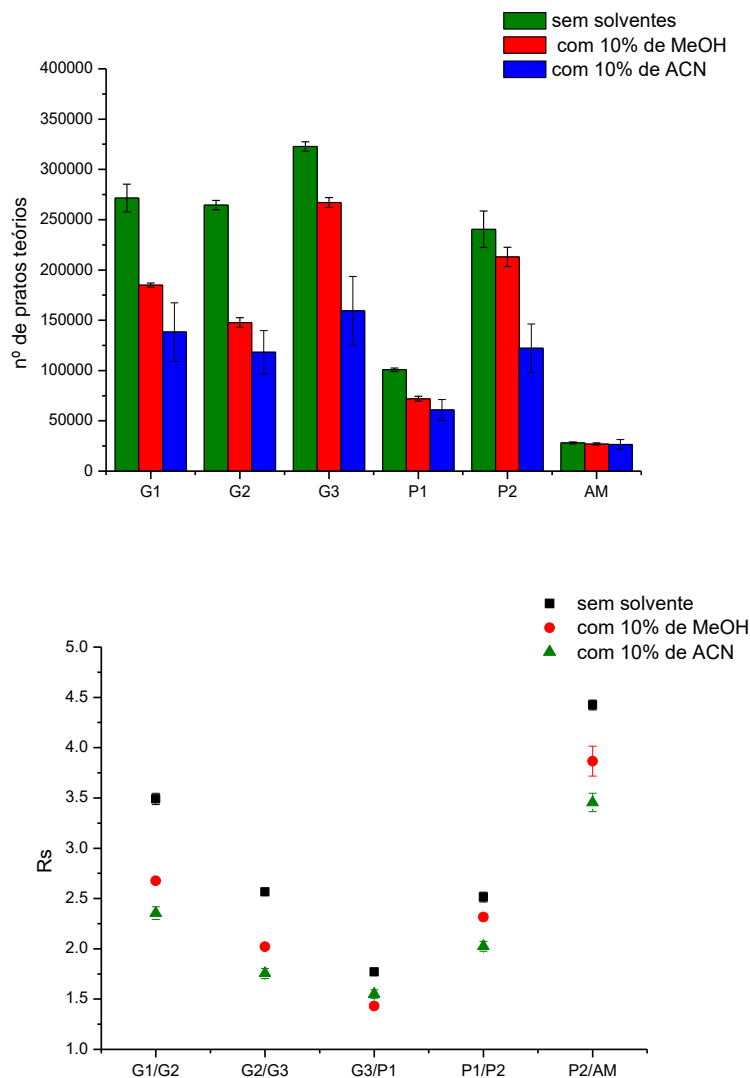


Legenda: eletroferograma da mistura padrão de 200,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de GM, PM e AM. Eletrólito 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazolpH 6,5 (A); 5,5 (B) e 2,5 (C). Temperatura de 29 °C. Tensão: 11 kV. Injeção 30 mbar x 7s. Capilar de 75 µm d. i. x 58,5 cm de comprimento total (50 cm de comprimento efetivo). Detecção: 400: 214 nm. Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.7.5. Efeito de Solventes Orgânicos no Eletrólito

Os solventes orgânicos são frequentemente utilizados para melhorar a solubilidade do analito, mas como os AG são bastante solúveis em água, isso não seria um fator a ser considerado. No entanto, como já discutido, os solventes podem afetar a viscosidade do eletrólito e até mesmo o pKa dos solutos e, devido a esses dois fatores, foi avaliado o efeito da presença de 10 % de MeOH ou 10% de ACN no eletrólito de corrida. O efeito ocasionado pela presença desses solventes foi insatisfatório, uma vez que, tanto a eficiência quanto a resolução, diminuíram para todos os picos. (Figura 58). Por esse motivo, não foi adicionado solvente no eletrólito.

**Figura 58.** Efeito de solventes orgânicos na eficiência e resolução dos componentes da GM, PM e AM



Legenda: efeito da presença de 10% de MeOH e 10% de ACN na eficiência (A) e resolução (B) dos picos. Condições: Eletrólito contendo 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol e 10% de ACN ou 10% MeOH, pH 2,5, temperatura de 29 °C, tensão de 11 kV, injeção de 30 mbar x 10 s e capilar de 75 µm d.i x 58,5 cm de comprimento total (50 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400:214 nm. Fonte: elaborado pelo autor.

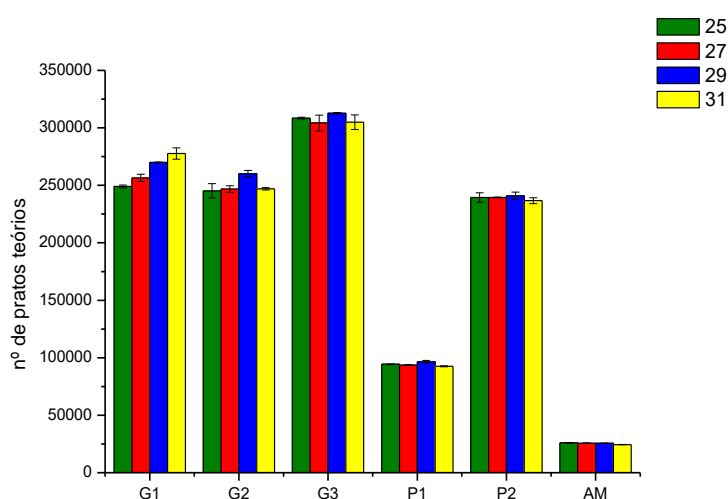
#### 4.1.7.6. Efeito da Temperatura no Sistema de Separação

O efeito da temperatura no sistema de separação foi avaliado no intervalo de 25 a 31 °C (a cada 2 °C). De forma geral, não foram observadas mudanças na

eficiência dos picos para a PM e AM, entretanto, foi possível observar um aumento na eficiência do pico 1 da GM com o aumento da temperatura e ainda um aumento da eficiência do pico 2 da GM, na de 29 °C (Figura 59).

Um outro comportamento observado foi a redução do tempo de corrida, após o aumento da temperatura (25 °C – 12,7 min; 27 °C– 12,3 min; 29 °C – 11,7 min, e 31 °C – 11,4 min). Isso ocorreu, provavelmente, devido à mudança na viscosidade do eletrólito, que alterou a mobilidade eletroforética de cada composto, já que nesse valor de pH o EOF é inexistente. A temperatura de 29 °C foi selecionada para os próximos experimentos.

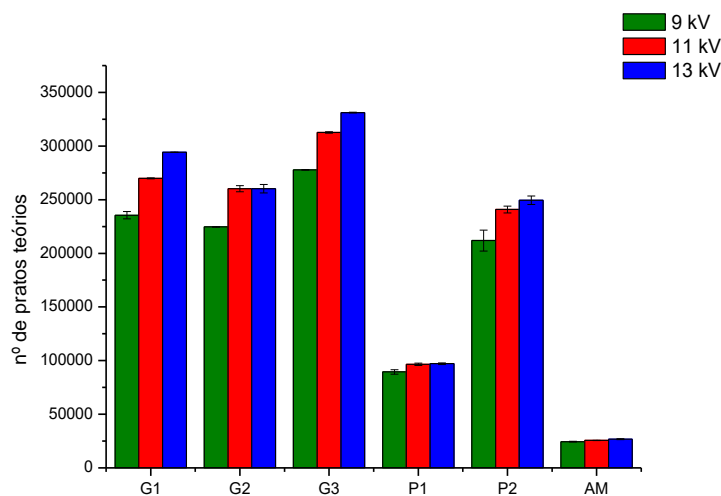
**Figura 59.** Efeito da temperatura na eficiência dos componentes da GM, PM e AM



Legenda: (G1) (G2) (G3): gentamicina; (P1) e (P2): paromomicina; (AM): amicacina. Condições: Eletrólito contendo 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol, pH 2,5, temperatura de 25-31 °C, tensão de 11 kV, injeção de 30 mbar x 10 s e capilar de 75 µm d.i x 58,5 cm de comprimento total (50 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400:214 nm. Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.7.7. Efeito da Tensão

Para selecionar o melhor valor de tensão aplicado ao sistema de separação, foram testados 9, 11 e 13 kV. Para a maioria dos picos, houve um aumento de eficiência relativo ao aumento da tensão, fenômeno que não ocorreu com os picos G2 e P1 (Figura 60). Com o objetivo de manter o melhor compromisso entre resolução, eficiência e tempo de análise, a tensão de 11 kV foi mantida para os próximos testes.

**Figura 60.** Efeito da tensão na eficiência dos componentes de GM, PM e AM

Legenda: (G1) (G2) (G3): gentamicina; (P1) e (P2): paromomicina; (AM): amicacina. Condições: Eletrólito contendo 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol, pH 2,5, temperatura de 29 °C, tensão de 9-13 kV, injeção de 30 mbar x 10 s e capilar de 75 µm d.i x 58,5 cm de comprimento total (50 cm de comprimento efetivo) e detecção em 400:214 nm. Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.7.8. Efeito do Tempo de Injeção

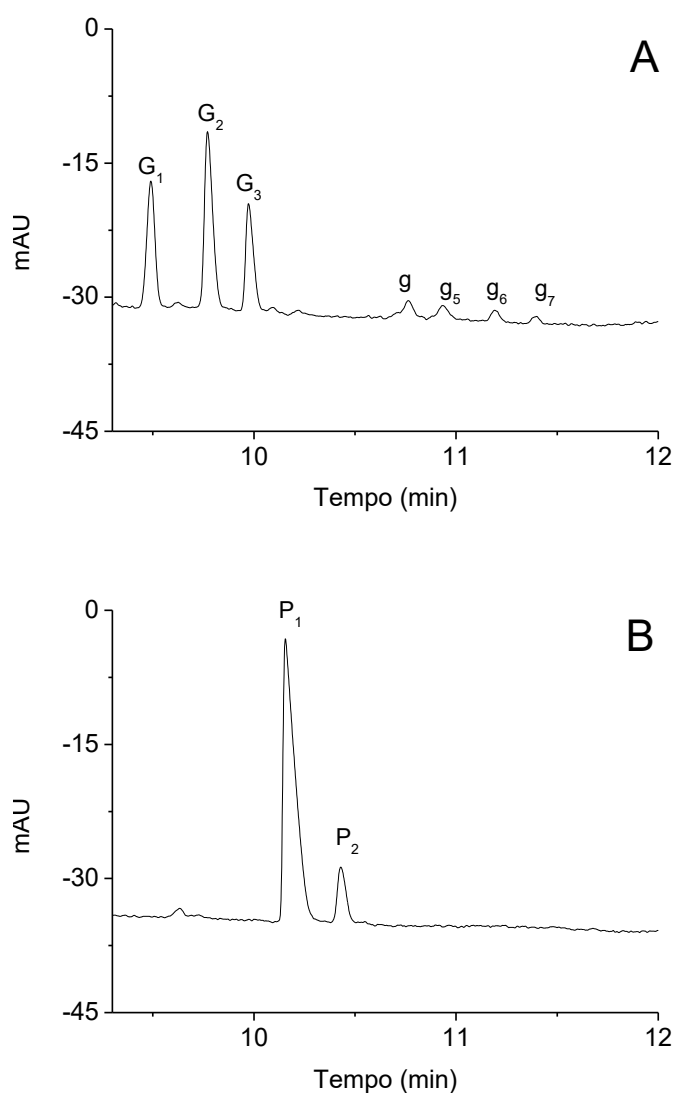
O tempo de injeção aumenta a quantidade de amostra que é inserida dentro do capilar e isso faz com que a magnitude do sinal analítico seja aumentada. Entretanto, um excesso de volume de amostra pode reduzir a resolução entre os picos (ALTRIA, 1996).

Os tempos de injeção de 4, 7 e 10 s foram avaliados mantendo a pressão em 30 mbar. O tempo de 7s foi escolhido, pois apresentou o melhor compromisso entre magnitude do sinal analítico de cada pico, sem comprometer resolução entre eles (resultados não mostrados).

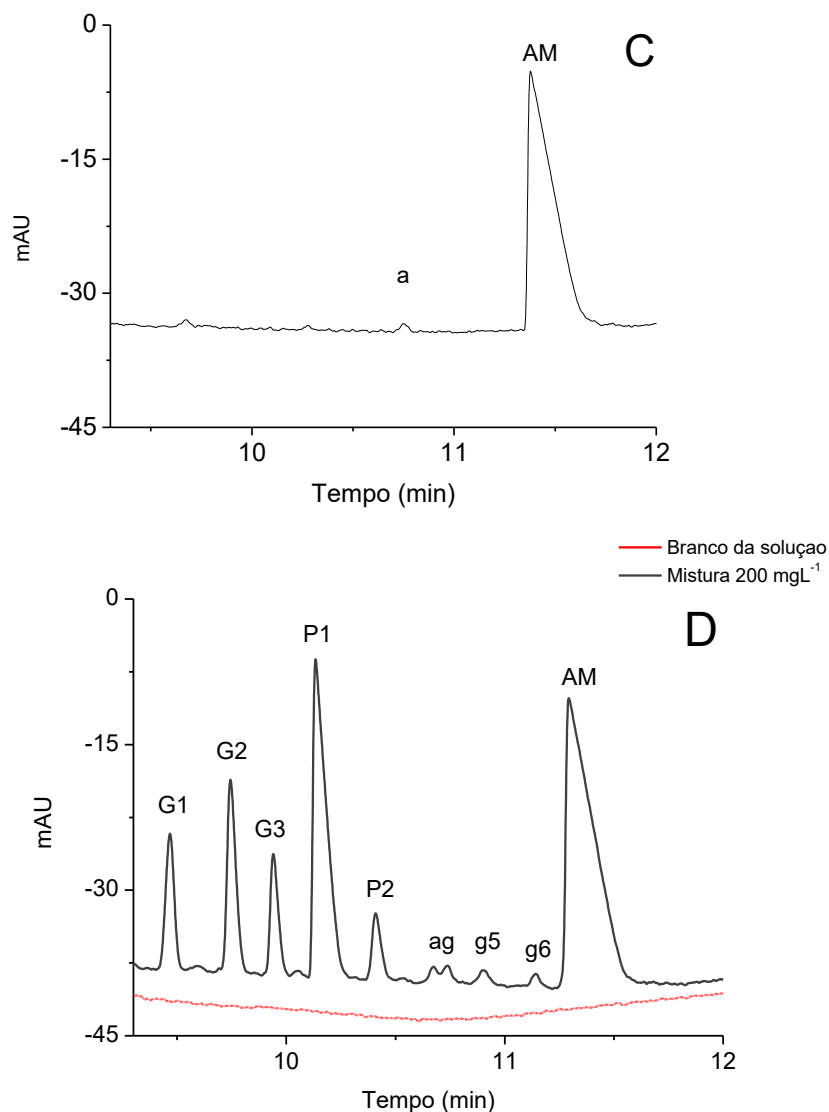
#### 4.1.7.9. Condições Otimizadas para o Método de Detecção Indireta

As condições otimizadas foram: eletrólito de corrida contendo  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de imidazol,  $\text{pH} = 2,5$ . O comprimento total do capilar foi de  $58,5 \text{ cm}$  total ( $50 \text{ cm}$  de comprimento efetivo), com injeção de  $30 \text{ mbar} \times 7 \text{ s}$ . A tensão aplicada foi de  $11 \text{ kV}$ , temperatura de  $29 \text{ }^\circ\text{C}$  e a detecção indireta: referência  $400 \text{ nm}$  / sinal:  $214 \text{ nm}$  (Figura 61).

**Figura 61.** Padrão de  $200,0 \text{ mg L}^{-1}$  de GM, PM e AM e mistura







Legenda: eletroferograma do padrão de 200,0 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de (A) GM, (B) PM e (C) AM e (D) branco e mistura de 200,0 mg L<sup>-1</sup> de todos eles. Eletrólito 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol pH 2,5. Temperatura de 29 °C. Tensão: 11 kV. Injeção 30 mbar x 7s. Capilar de 75 µm d. i. x 58,5 cm de comprimento total (50 cm de comprimento efetivo). Detecção: 400: 214 nm. Identificação dos picos: (G1), (G2), (G3), (g) (g5), (g6) e (g7) gentamicina, (P1) e (P2): paromomicina, (AM) e (a): amicacina. Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.7.10. Validação do Método

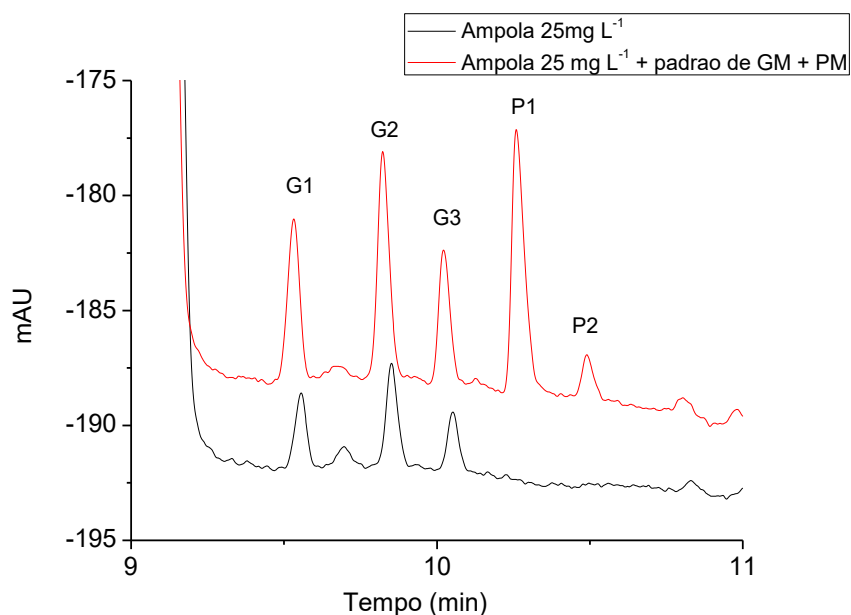
A validação desse método consistiu em verificar a seletividade em amostras de GM contendo 25,0 mg L<sup>-1</sup> base do padrão de GM e PM, a linearidade no intervalo de concentração de 50,0 a 1000,0 mg L<sup>-1</sup> (sulfato) para cada aminoglicosídeo, a precisão (repetibilidade e precisão intermediária), os limites de detecção e quantificação, bem

como a exatidão do método, expressam na forma de recuperação. A validação foi baseada na ICH, conforme descrito no item 3.3.3

#### 4.1.7.10.1. Seletividade, LOD, LOQ e Linearidade

A seletividade do método foi demonstrada com a adição de 25,0 mg L<sup>-1</sup> da mistura de GM e PM (base) na amostra comercial de GM diluída (Figura 62). Esse procedimento foi feito com o objetivo de mostrar que os principais componentes de ambos os fármacos são separados quando estes se encontram no meio contendo os excipientes na amostra comercial (ácido láctico, hidróxido de sódio, metabissulfito de sódio e água para injetáveis) e que não há interferentes na amostra capaz de prejudicar a separação.

**Figura 62.** Amostra comercial e amostra comercial fortificada com 25,0 mg L<sup>-1</sup> de GM e PM (base).



Legenda: eletroferograma do branco da solução (amostra comercial diluída) e da mistura padrão de 25,0 mg L<sup>-1</sup> de GM e PM base. Eletrólito 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol pH 2,5. Temperatura de 29 °C. Tensão: 11 kV. Injeção 30 mbar x 7s. Capilar de 75 µm d. i. x 58,5 cm de comprimento total (50 cm de comprimento efetivo). Detecção: 400: 214 nm. Identificação dos picos: (G1), (G2), (G3): Gentamicina, (P1) e (P2): Paromomicina. Fonte: elaborado pelo autor.

A linearidade do método foi estabelecida no intervalo de 29,5 a 590,0 mg L<sup>-1</sup> base para GM; 33,8 a 675,0 mg L<sup>-1</sup> base de PM e 33,4 a 667,6 mg L<sup>-1</sup> base para AM (n=3). Nesse intervalo, o método apresentou valores de r de 0,9983 - 0,9999. Esses

resultados estão de acordo com outros métodos descritos na literatura (Tabela 5) (KAALE et al., 2000).

**Tabela 5.** Parâmetros obtidos da curva analítica dos AG utilizando o método de detecção indireta

<i>Curva analítica em água ultrapurificada</i>				
<i>Analito</i>	<i>Equação da reta</i>	<i>r</i>	<i>LOD# (mg L<sup>-1</sup>)</i>	<i>LOQ# (mg L<sup>-1</sup>)</i>
G <sub>1</sub>	Y = 0,332X + 0,01652	0,9996	11,8	39,4
G <sub>2</sub>	Y = 0,476x - 0,289	0,9996	6,8	22,7
G <sub>3</sub>	Y = 0,246x + 2,87	0,9983	19,7	65,6
G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub> + G <sub>3</sub>	Y = 1,055x + 2,59	0,9995	-	-
P <sub>1</sub>	Y = 0,138x + 9,70	0,9985	3,2	10,7
P <sub>2</sub>	Y = 0,1385x + 0,227	0,9983	25,3	84,4
P <sub>1</sub> + P <sub>2</sub>	Y = 1,082x + 9,99	0,9986	-	-
AM	Y = 2,013x - 6,46	0,9999	2,1	6,9

Legenda: valores de LOD/ LOQ na forma de base # S/N= 3; ## S/N =10 Onde S: sinal e N= ruído. Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.7.10.2. Precisão

Os valores do coeficiente de variação (% CV) para repetibilidade do método variaram entre 0,9 e 8,9 % e, para precisão intermediária, entre 1,5 e 9,7 %, considerando os componentes individuais e a soma deles para cada AG (Tabela 6), entretanto, para as análises quantitativas, foram utilizados os valores da soma, tanto da GM quanto da PM, cujos valores de CV para repetibilidade e precisão intermediária não ultrapassaram 2,9 e 6,6 %, respectivamente. Sendo assim, esses resultados estão próximos aos obtidos por outros autores na detecção indireta de diferentes compostos utilizando a CE

**Tabela 6.** Resultados da precisão do método utilizando imidazol em detecção indireta

Analito	50,0 (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>		500,0 (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>		1000,0 (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	
	Rep# (%)	Precisão int <sup>##</sup> (%)	Rep# (%)	Precisão int <sup>##</sup> (%)	Rep# (%)	Precisão int <sup>##</sup> (%)
G <sub>1</sub>	2,2	5,5	1,5	2,3	1,2	2,2
G <sub>2</sub>	3,2	7,8	1,6	2,0	1,9	2,0
G <sub>3</sub>	4,2	5,4	0,9	1,9	1,3	3,2
G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub> + G <sub>3</sub>	1,9	5,3	1,4	2,0	1,5	2,0
P <sub>1</sub>	2,6	6,3	1,7	2,8	1,5	2,0
P <sub>2</sub>	8,9	9,7	1,1	3,6	2,1	2,4
P <sub>1</sub> + P <sub>2</sub>	2,9	6,6	1,6	2,9	1,1	1,5
AM	1,4	3,4	1,3	3,0	2,1	2,4

Onde: <sup>a</sup> corresponde à concentração do sal que equivale a 29,5 mg L<sup>-1</sup> de GM; 33,7 mg L<sup>-1</sup> de PM e 33,4 mg L<sup>-1</sup> de AM; <sup>b</sup> equivale a 295,0 mg L<sup>-1</sup> de GM; 337,5 mg L<sup>-1</sup> de PM e 334,0 mg L<sup>-1</sup> de AM; <sup>c</sup> equivale a 590,0 mg L<sup>-1</sup> de GM; 675,0 mg L<sup>-1</sup> de PM e 667,0 mg L<sup>-1</sup> de AM. #Repetibilidade n = 3 e ## Precisão intermediária n = 9. Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.1.7.10.3. Recuperação

O intervalo dos valores de recuperação variaram de 95,7 - 105,7 % (Tabela 7). Com base na literatura, os resultados foram satisfatórios, uma vez que o intervalo aceitável para os valores de recuperação depende da concentração do analito (ANVISA, 2003). Para o intervalo de concentração em mg L<sup>-1</sup>, os valores aceitáveis de recuperação estão entre 80 e 110%.

**Tabela 7.** Resultados da recuperação do método utilizando imidazol em detecção indireta

Analito	50,0 (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	500,0 (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	900,0 (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>
	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)
G <sub>1</sub>	105,7	96,4	103,8
G <sub>2</sub>	103,2	96,7	102,9
G <sub>3</sub>	102,2	96,2	102,0
G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub> + G <sub>3</sub>	-	-	-
P <sub>1</sub>	104,2	98,1	101,5
P <sub>2</sub>	102,8	95,7	101,2
P <sub>1</sub> + P <sub>2</sub>	-	-	-

Onde: <sup>a</sup> corresponde à concentração do sal que equivale a 29,5 mg L<sup>-1</sup> de GM; 33,7 mg L<sup>-1</sup> de GM de PM e 33,4 mg L<sup>-1</sup> de GM; <sup>b</sup> equivale a 295,0 mg L<sup>-1</sup> de GM; 337,5 mg L<sup>-1</sup> de GM de PM e 334,0 mg L<sup>-1</sup> de AM; <sup>c</sup> equivale a 531,0 mg L<sup>-1</sup> de GM; 607,5 mg L<sup>-1</sup> de PM de PM e 600,8 mg L<sup>-1</sup> de AM. Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.1.7.10.4. Aplicação do método

Para demonstrar o desempenho do método, foram feitas duas aplicações. A primeira consistiu em quantificar amostras comerciais de GM (Tabela 8) e a segunda aplicação foi realizada com o objetivo de simular um sistema SLC, utilizando para isso uma membrana de diálise e soluções da mistura de GM e PM (item 3.3.1.7.1), sendo os valores encontrados em diferentes tempos apresentados em uma curva de liberação (Figura 64) para posterior comparação com os SLC desenvolvidos neste trabalho.

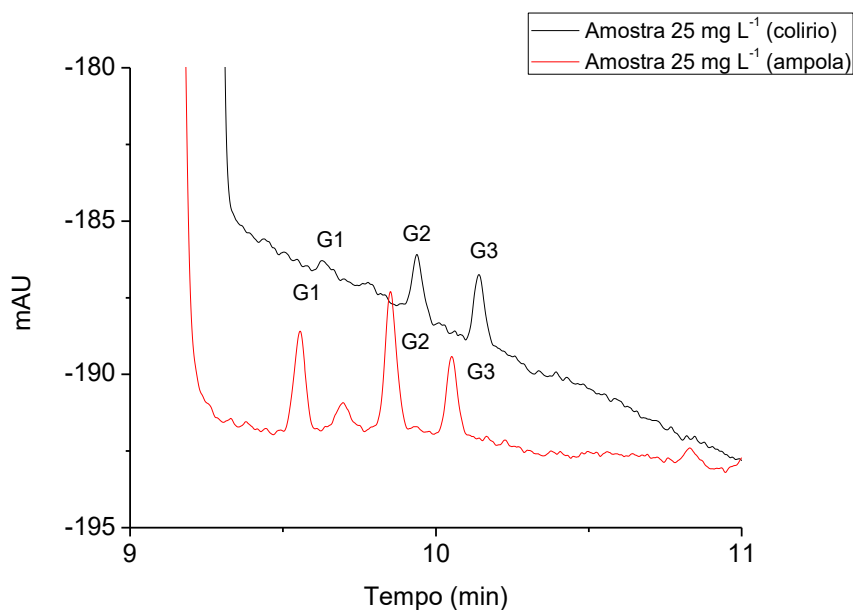
**Tabela 8.** Concentração de GM base nas amostras comerciais ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) - média  $\pm$  DP

Amostras	Método de detecção indireta por CE (MDI)				Método ninidrina (MEN)	Valor na embalagem ( $\text{mg mL}^{-1}$ )
	G1 (%)	G2 (%)	G3 (%)	GM Total	GM Total	GM Total
Colírio A	11,0 $\pm$ 0,4	42,8 $\pm$ 1,8	46,2 $\pm$ 1,9	2,4 $\pm$ 0,10	3,0 $\pm$ 0,16	3,0
Colírio B	17,0 $\pm$ 0,7	51,1 $\pm$ 2,1	31,9 $\pm$ 1,2	2,7 $\pm$ 0,11	2,7 $\pm$ 0,21	3,0
Suspensão otológica	19,2 $\pm$ 0,8	47,7 $\pm$ 1,7	32,5 $\pm$ 1,4	2,7 $\pm$ 0,13	2,4 $\pm$ 0,14	2,7
Ampola	32,8 $\pm$ 1,4	43,7 $\pm$ 1,5	23,5 $\pm$ 1,7	39,0 $\pm$ 1,5	38,6 $\pm$ 2,7	40,0
padrão de GM em água <sup>#</sup>	30,9 $\pm$ 0,9	44,3 $\pm$ 1,1	24,8 $\pm$ 0,8	-	-	-

Legenda: n<sup>#</sup> = 10. MDI: método de detecção indireta por eletroforese capilar, MEN: método espectrofotométrico com ninidrina

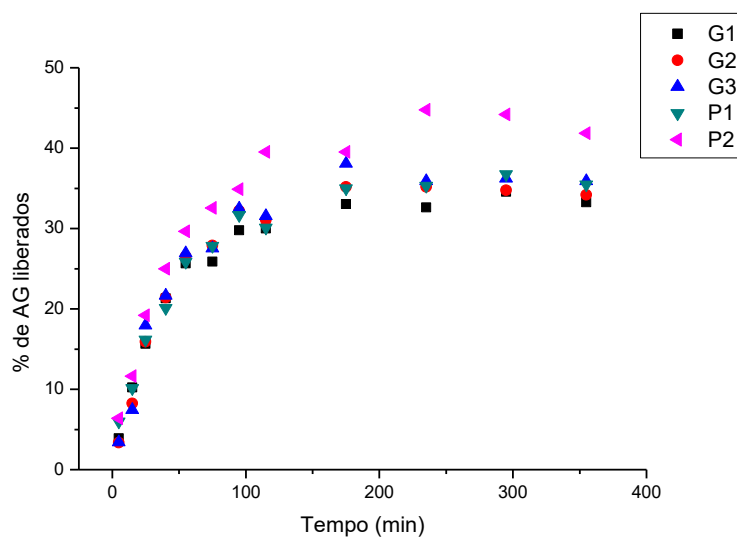
As análises das amostras comerciais realizadas com o método de detecção indireta mostraram resultados de concentração similares aos descritos nos rótulos das embalagens. No entanto, é possível visualizar nos valores de % de cada pico que algumas amostras divergem bastante em relação aos componentes da GM. Quando comparados, o método indireto não se diferenciou significativamente do método da ninidrina, de acordo com o teste T. O valor de  $T_{\text{tabelado}}$  para três graus de liberdade foi de 3,182 ( $\alpha = 0,05$ ), o valor do  $T_{\text{calculado}}$  foi de 0,054 ( $p$  bilateral = 0,960). Portanto, pode-se afirmar, com 95% de confiança, que não existe diferença entre os métodos. O mesmo foi observado quando se comparou o método indireto com os valores descritos nas embalagens ( $T_{\text{calculado}} = -2,163$  com  $p$  bilateral = 0,119).

A Figura 63 mostra uma comparação entre os eletroferogramas de duas amostras distintas, do colírio A e da ampola injetável de GM.

**Figura 63.** Comparação dos eletroferogramas de duas amostras diferentes

Legenda: eletroferogramada amostra diluída para 25,0 mg L<sup>-1</sup> (base) de colírio (preto) e da amostra da ampola injetável (vermelho). Eletrólito 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol pH 2,5. Temperatura de 29 °C. Tensão: 11 kV. Injeção 30 mbar x 7s. Capilar de 75 µm d. i. x 58,5 cm de comprimento total (50 cm de comprimento efetivo). Detecção: 400: 214 nm. Identificação dos picos: (G1), (G2), (G3): Gentamicina. Fonte: elaborado pelo autor.

Como já mencionado, foi realizado um experimento de liberação utilizando uma membrana de diálise e uma mistura padrão de GM e PM. Esse teste teve como objetivo avaliar se o método indireto utilizando imidazol poderia ser empregado em análises de SLC. Sendo assim, foi possível verificar que o uso desse método para análise do perfil de liberação foi satisfatório para as condições utilizadas, uma vez que foi possível registrar o aumento da liberação em função do tempo até 115 min, e após 200 min o sistema de liberação mostrou-se estável para os picos G1, G2, G3, P1 e P2 (resultados típicos ao obtidos em perfis de liberação). O comportamento observado condiz com os resultados observados na literatura para esses tipos de sistemas (CHAISRI et al., 2011; FLORES et al., 2016) (Figura 64).

**Figura 64.** Perfil de liberação GM e PM em função do tempo.

Legenda: Gráfico do perfil de liberação da mistura padrão de GM e PM utilizando o método de detecção indireta. Membrana de diálise (12000 – 16000 Da) com 4 cm x 3,2 cm. A membrana foi a 37 °C em banho-maria. Identificação: (G1), (G2), (G3): Gentamicina (P1), (P2): Paromomicina. Fonte: elaborado pelo autor.

## 4.2. SÍNTESE DAS MICROESFERAS

Após a otimização e validação dos dois métodos desenvolvidos neste trabalho para a separação e quantificação da GM e PM, foi feita uma investigação sobre sua aplicação em análises quantitativas de SLC, utilizando microesferas (MS) de PLGA carregadas com ambos os fármacos. No entanto, não havia sido descrito na literatura um método para a obtenção de MS de PLGA contendo, simultaneamente, PM e GM. Por essa razão, essa etapa do trabalho consistiu em investigar a utilização de alguns procedimentos descritos na literatura para obtenção de MS, utilizando o método de dupla evaporação por solvente (Quadro 13).

**Quadro 13.** Procedimentos avaliados para a síntese das microesferas.

Protocolo	Composição	Formação das MS	Figura
01	Controle (água)	✓	Figura 65
	9,0 mg PM + 1,0 mg GM	✓	Figura 65
02	4,0 mg PM	✓	Figura 66
	10,0 mg PM	x	-
	4,0 mg GM	✓	Figura 66
	10,0 mg GM	x	-
	4,0 mg PM + 1,0 mg GM	✓	Figura 67
	Replicadas da última síntese	x	-
03	Controle (água)	✓	Figura 68
	10,0 mg PM	x	-
	10,0 mg PM c/ NaOH	✓	Figura 69
04	Controle (água)	✓	Figura 71
	16,0 mg PM + 4,0 mg GM	✓	Figura 71
	Replicadas da última síntese	✓	-

Legenda: (vermelho) não foi possível analisar no MEV, devido às características da amostra (verde) amostras analisadas no MEV. Fonte: elaborado pelo autor.

O protocolo 01 foi adaptado do trabalho de Ismail e colaboradores (2012), que propuseram um método de obtenção de MS como um SLC de GM para o tratamento de Osteomelite, infecção ortopédica primariamente causada por *Staphylococcus aureus*, para controlar a alta toxicidade na administração intravenosa de forma prolongada do fármaco. A emulsão primária foi preparada pela dissolução de 100,0 mg de PLGA (50:50) em 2,0 mL de diclorometano, sendo homogeneizada



posteriormente com uma solução que continha 100,0 mg de gentamicina. A segunda emulsão foi preparada após a injeção da emulsão primária em uma solução de PVA 1,0 % (m/v) que continha 10 vezes o volume da primária, também sendo homogeneizada. Após a liofilização, os autores obtiveram valores de eficiência no encapsulamento de 9,95% até 83,51%.

Neste trabalho, foram realizados dois procedimentos utilizando esse método. O primeiro, consistiu em utilizar água ultrapurificada (controle) e, no segundo, foi utilizada uma mistura de GM/PM na primeira emulsão. As adaptações foram nos equipamentos utilizados, no tipo de PLGA (80:20) e na composição e quantidade dos fármacos (9,0 mg de PM e 1,0 mg de GM) (Quadro 14).

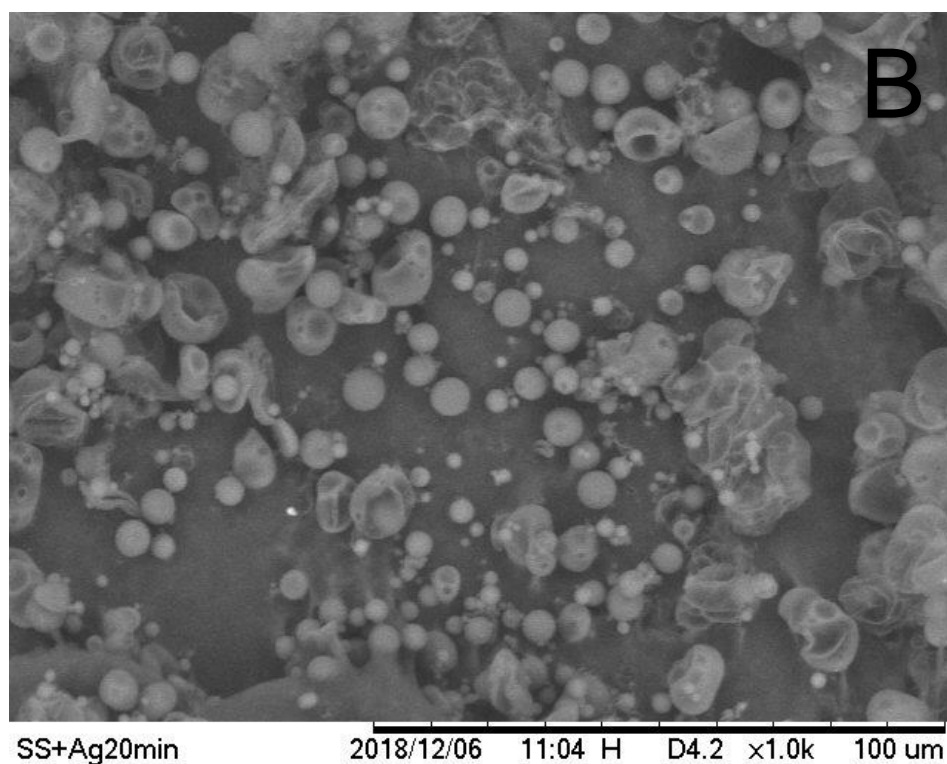
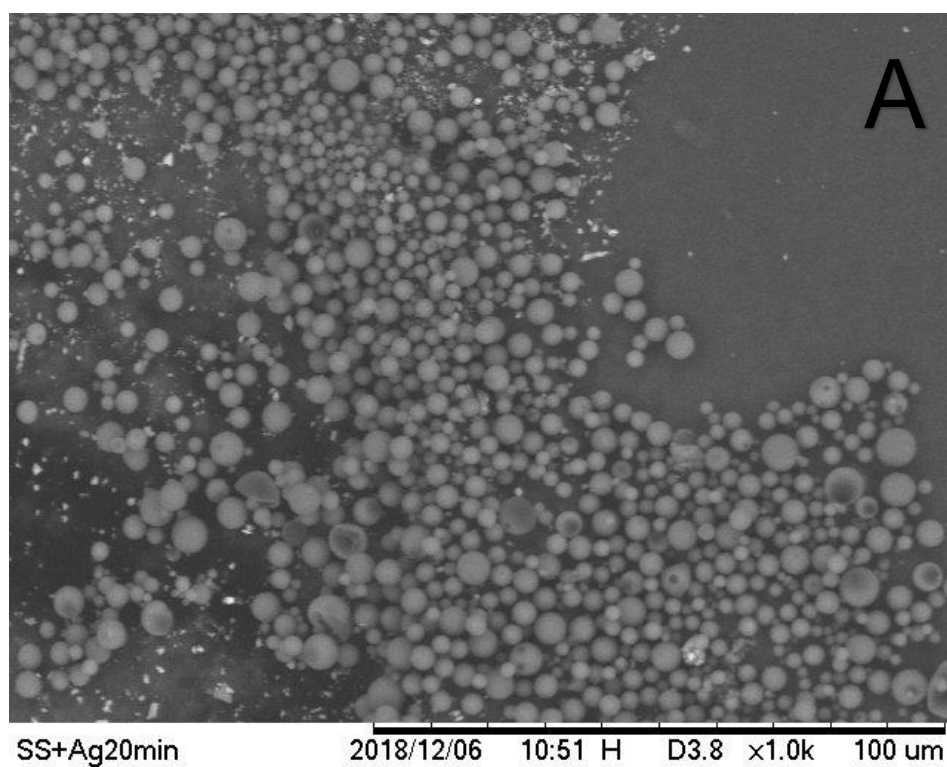
**Quadro 14.** Comparação entre os procedimentos da literatura e as adaptações feitas neste trabalho.

<b>Literatura</b>	<b>Adaptações</b>
PLGA (50:50)	PLGA (80:20)
10,0 mg de GM	9,0 mg de PM + 1,0 mg de GM
Tanque de alta agitação	Agitador magnético

Fonte: elaborado pelo autor

Os resultados obtidos para esse protocolo estão apresentados nas Figuras 65 A e B.

**Figura 65.** Imagens de MEV referentes à obtenção de MS pelo protocolo 01



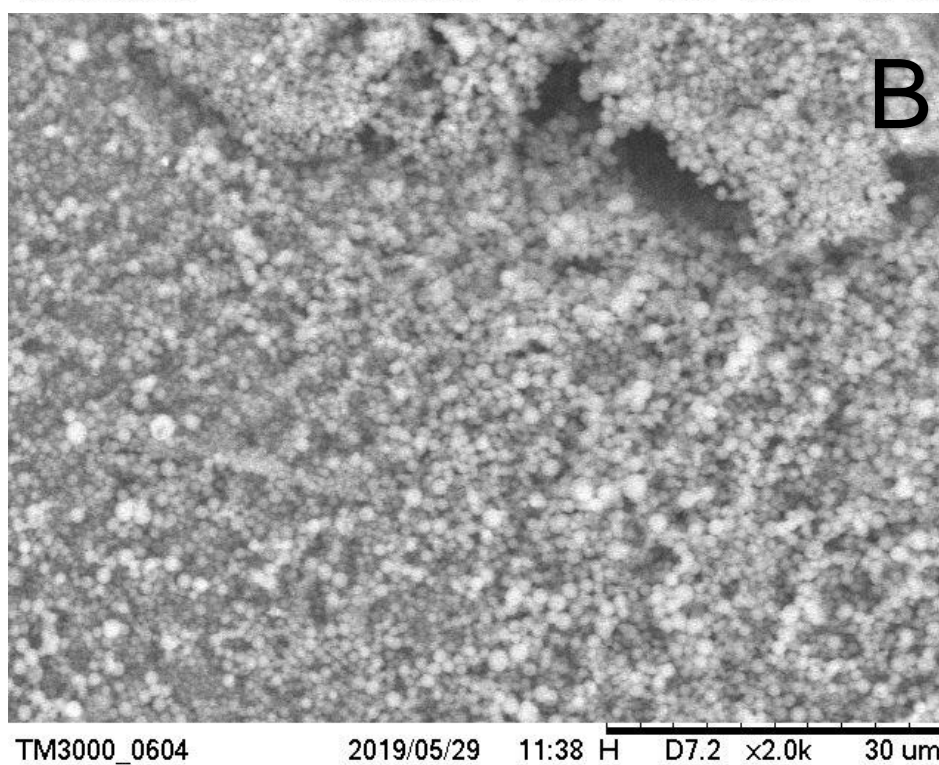
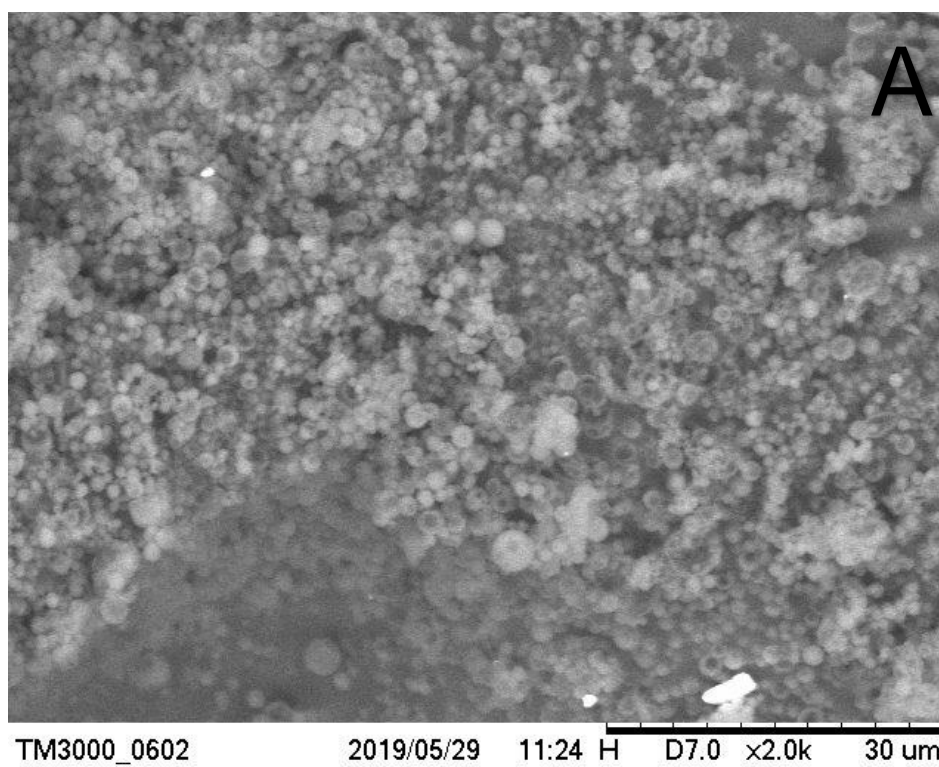
Legenda: (A) obtenção feita com água (controle) (B) obtenção feita com 10,0 mg de AG total. Fonte: elaborado pelo autor

Com base nas imagens da microscopia eletrônica de varredura apresentadas, foi possível observar que na amostra controle houve formação de MS e a imagem mostra maior homogeneidade de diâmetro e formato (Figura 65 A) do que em relação à amostra contendo a mistura de AG (Figura 65 B), na qual, apesar de possuir MS, é possível também visualizar partículas de outros formatos. Tal fenômeno pode ser explicado com base no efeito que a concentração de AG apresentou no procedimento utilizado. De acordo com Posadowska e colaboradores (2015), a quantidade do fármaco é um fator que pode alterar os parâmetros de solubilização, bem como o tamanho das partículas.

Tendo em vista o comportamento observado, foi avaliado um novo protocolo (protocolo 02) com duas concentrações distintas (4,0 mg e 10,0 mg de AG na primeira emulsão), apenas utilizando um único AG (PM ou GM). Optou-se pela utilização do padrão somente com um AG, a fim de diminuir as variáveis da síntese. No protocolo 02, adaptado de um fórum para pesquisadores, uma massa de 100,0 mg de PLGA foi dissolvida em 5,0 mL de clorofórmio. Após completa solubilização, essa mistura foi homogeneizada com o padrão do fármaco, contendo  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH e homogeneizada, novamente, com 10,0 mL de PVA 2% (m/v) e 5,0 mL de MeOH (GUPTA, 2017). Por fim, essa mistura foi agitada por 5 horas e liofilizada para posterior análise.

Nos resultados (Figuras 66 A e 66 B), é possível observar que as amostras contendo 4,0 mg de PM ou GM possuíam MS, mas as amostras contendo 0,01 g deles permaneceram como um bloco único de polímero, não sendo possível a análise no microscópio.

**Figura 66.** Imagens de MEV referentes à obtenção de MS pelo protocolo 02

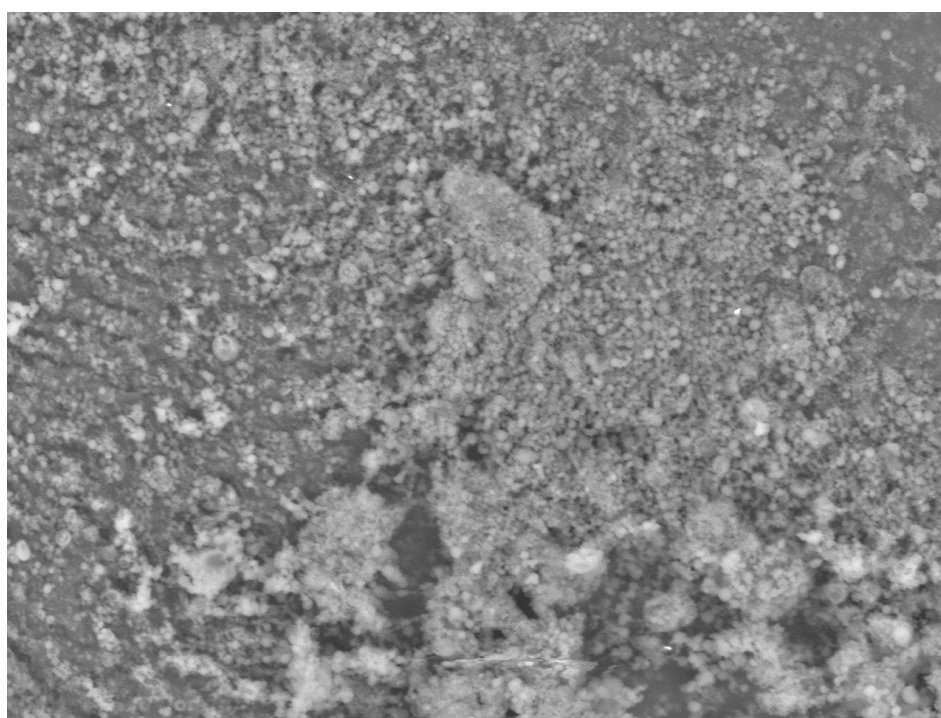


Legenda: (A) obtenção feita com 4,0 mg de PM (B) obtenção feita com 4,0 mg de GM. Fonte: elaborado pelo autor

Há diferentes fatores que afetam o processo de obtenção de partículas utilizando o método de dupla emulsão por evaporação de solvente, como por exemplo, o tipo de solvente e polímero, a concentração do polímero, o mecanismo de homogeneização, a concentração do fármaco, entre outros (TIWARI; VERMA, 2011; MOHAMMADI-SAMANI; TAGHIPOUR, 2015). Já foi descrito em trabalhos da literatura que o aumento da taxa fármaco/polímero pode ocasionar emulsões instáveis e, conseqüentemente, formação de grandes agregados, inviabilizando o isolamento das microesferas (CAVALIER; BENOIT; THIES, 1986).

Sabendo que o tipo de fármaco também é outro fator limitante para a obtenção da MS, a próxima amostra foi feita com o mesmo protocolo (02), mas contendo os dois AG (4,0 mg de PM e 1,0 mg de GM) na emulsão primária (figura 67).

**Figura 67.** Imagem de MEV referente à obtenção de MS pelo protocolo 02



TM3000\_1131 2019/07/30 09:48 H D6.6 x1.5k 50 um

Legenda: obtenção feita com 0,004 g de PM e 0,001 g de GM. Fonte: elaborado

pelo autor

De acordo com esses resultados, a mistura de GM e PM (nas condições utilizadas) interferiu na homogeneidade da amostra, mas ainda sim foi possível observar microesferas. Após esse primeiro resultado, essa metodologia foi feita novamente algumas vezes, mas a reprodutibilidade em algumas dessas amostras não foi satisfatória, mesmo com amostras controle. Essa falta de reprodutibilidade pode

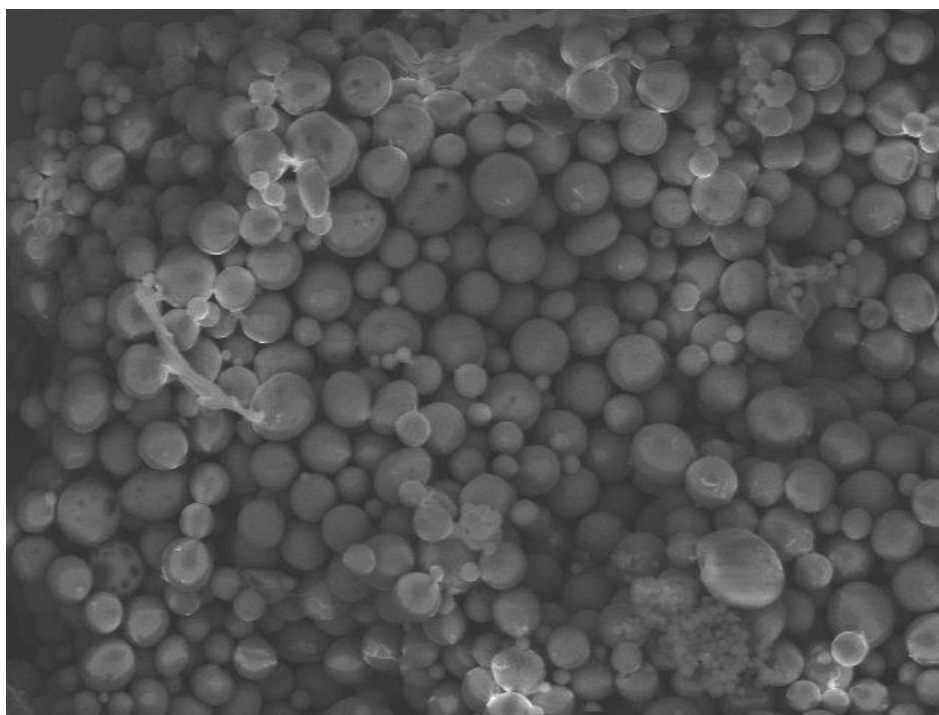
estar relacionada às condições ambientais (variação de temperatura) e variações na velocidade de agitação durante o processo para evaporação do solvente.

Após várias tentativas insatisfatórias de obtenção das microesferas pelo procedimento do protocolo 02, um protocolo de síntese baseado no trabalho de Abdelghany e colaboradores (2019) foi realizado. Esses autores encapsularam AM e moxifloxacina, dois antibióticos de propriedades hidrofílicas em nanopartículas de PLGA modificadas, nas quais incluiu-se alginato na composição, a fim de aumentar a quantidade de droga carregada.

O protocolo adaptado consistiu em misturar 10,0 mg ou 4,0 mg de PM em 2,0 mL de água ultrapurificada. Em seguida, foram adicionados 20,0 mg de alginato de sódio nessa solução, qual foi aquecida por 5 min a 50 °C para a solubilização. Um volume de 1,0 mL dessa mistura foi adicionado em 100,0 mg de PLGA, que tinha sido previamente solubilizado em 2,0 mL de diclorometano (DCM) e homogeneizado. Em seguida, a emulsão 1 foi adicionada a 10,0 mL de PVA 2 % (m/v), contendo 20,0 mg de CaCl<sub>2</sub>. Essa mistura foi homogeneizada mais uma vez, antes da agitação para evaporação do solvente e liofilização.

Foram avaliadas essas condições com e sem a PM. Ao testar essas condições com PM, a solubilização não ocorreu conforme descrito no protocolo, mesmo após o aquecimento. Por esse motivo, somente foi possível analisar a amostra controle (sem a PM) (Figura 68).

**Figura 68.** Imagem de MEV referente à obtenção de MS pelo protocolo 03

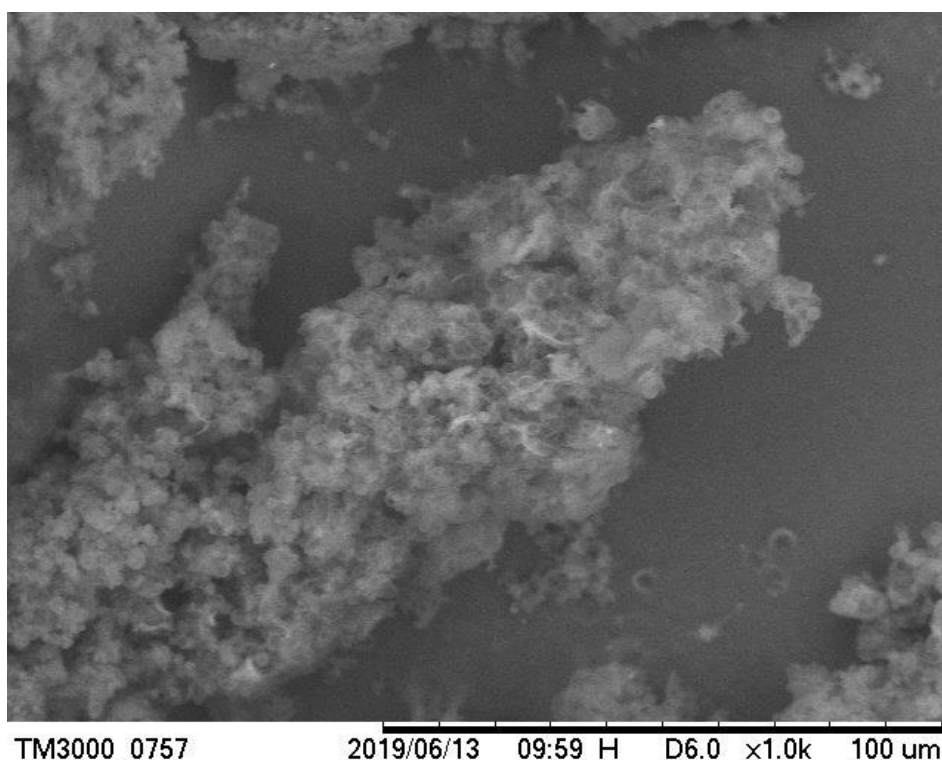


TM3000\_0762 2019/06/13 10:17 H D6.1 x1.0k 100 um

Legenda: obtenção feita com água (controle). Fonte: elaborado pelo autor.

Com o objetivo de solubilizar a PM na solução de alginato, uma massa de 10,0 mg de PM foi dissolvida em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH. Com isso, os grupos amina presentes na molécula se tornam neutros e incapazes de reagir com o alginato, que é um composto carregado negativamente. Os demais procedimentos foram semelhantes aos da amostra anterior (Figura 69)

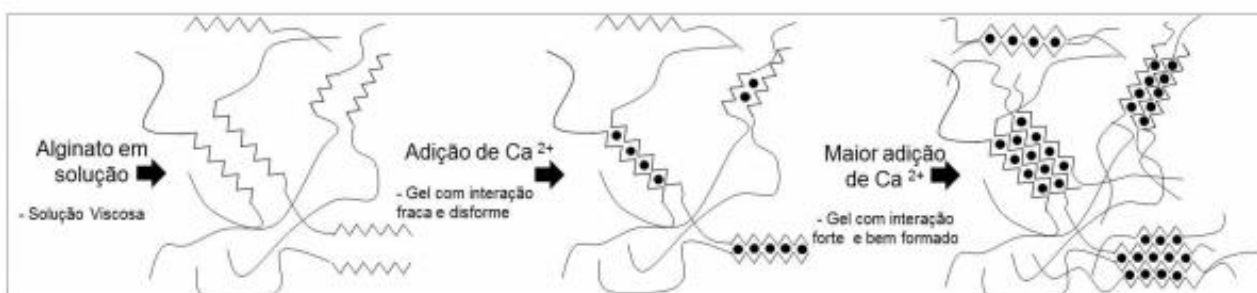
**Figura 69.** Imagem de MEV referente à obtenção de MS pelo protocolo 03



Legenda: obtenção feita com 10,0 mg de PM diluída em 0,5 mol L<sup>-1</sup> de NaOH. Fonte: elaborado pelo autor

Com base nas imagens, foi possível identificar uma amostra bastante heterogênea. Em alguns pontos, foi possível visualizar a presença de microesferas (resultados não mostrados) e, em outros pontos, foram identificadas estruturas de padrão irregular (Figura 69). Esse resultado pode ser explicado pelo aumento da concentração de íons sódio (Na<sup>+</sup>) na amostra e sua interação com as cadeias de alginato, já que, segundo Wan e colaboradores (2008), íons monovalentes podem competir com íons de cálcio nos sítios de junção e enfraquecer o gel de alginato (Figura 70).

**Figura 70.** Esquema da reticulação do alginato



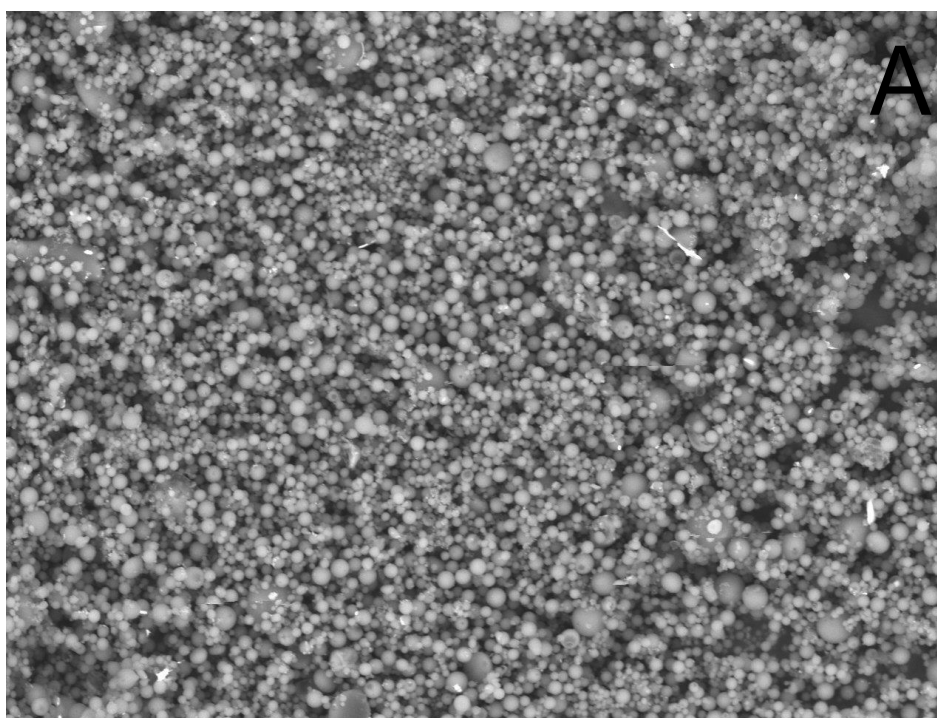
Fonte: SANTOS, (2018)



Por último, foi avaliado o protocolo 04, que se baseia em um método já utilizado no laboratório de biomateriais da PUC-Sorocaba, no qual os autores estudaram a liberação controlada de doxiciclina encapsulada em microesferas de PLGA no tratamento de pacientes com periodontite crônica. Foi feita uma aplicação na bolsa periodontal e, posteriormente, uma coleta de fluido gengival crevicular, durante vinte dias. Após análise por HPLC, foi verificado que a liberação ocorreu de forma estável (MOURA et al., 2015).

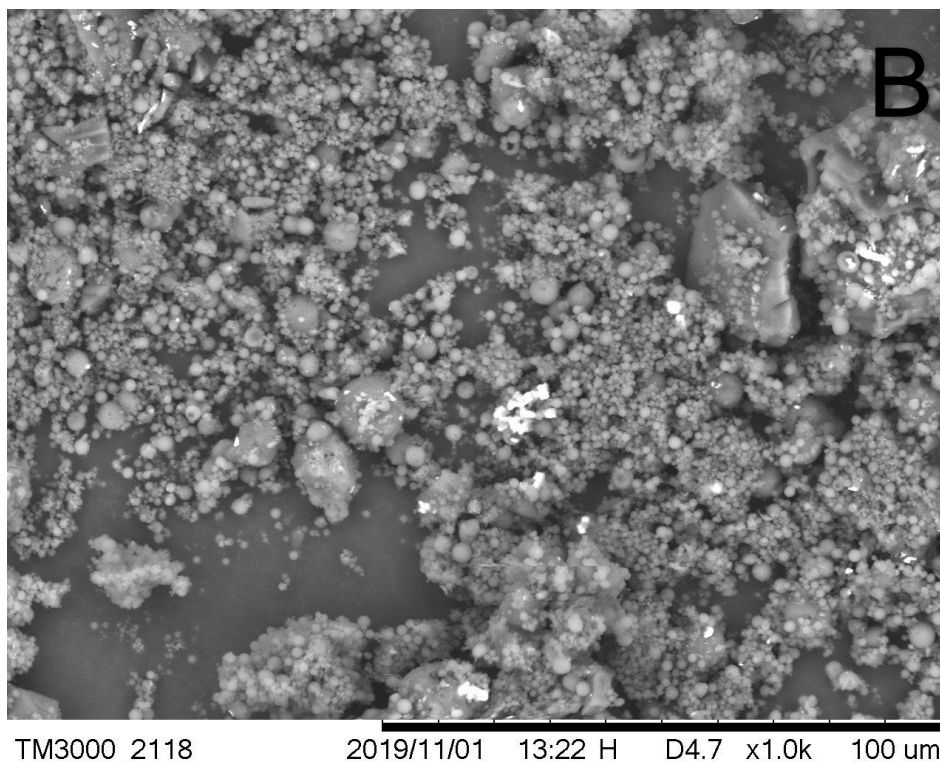
As duas principais diferenças desse método (descrito no item 3.3.2.1) em relação aos testados anteriormente foi a presença de NaCl na solução de PVA (m/v) e o aumento da concentração de fármaco na primeira emulsão (20,0 mg de AG total). Na Figura 71 é possível observar a imagem de microscopia da amostra controle (água) e a do padrão (16,0 mg de PM e 4,0 mg de GM), utilizando o método adaptado de Moura e colaboradores (2015).

**Figura 71.** Imagens de MEV referente à obtenção de MS pelo protocolo 03



TM3000\_2114

2019/11/01 13:16 H D4.8 x1.0k 100 um



Legenda: (A) obtenção feita água e (B) obtenção feita com 16,0 mg de PM e 4,0 mg de GM. Fonte: elaborado pelo autor

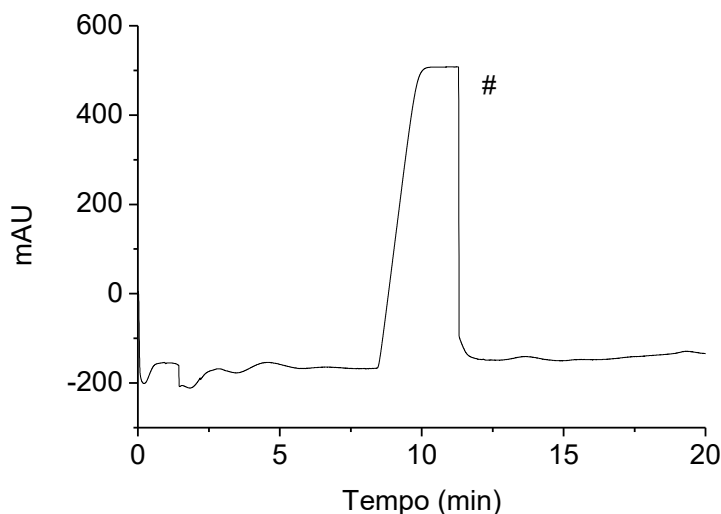
Assim como o método proposto no protocolo 02, a amostra contendo os fármacos é menos homogênea do que a amostra controle, na qual há a presença de microesferas, mas também há partículas de formatos irregulares. Diferentemente da metodologia anterior, nessa foi possível reproduzir várias amostras em laboratório. Por esse motivo, as amostras produzidas com esse método foram selecionadas para a etapa de análise de eficiência de encapsulamento, utilizando o método de detecção indireta e o método com OPA.

### 4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS

#### 4.3.1. Eficiência de encapsulação

Durante o processo de obtenção das microesferas, após a centrifugação, foi produzido um sobrenadante contendo os AG que não foram encapsulados nas MS, PVA, H<sub>2</sub>O, Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. Com o objetivo de calcular a eficiência no encapsulamento, o sobrenadante foi analisado. Inicialmente, essa amostra foi analisada pelo método de detecção indireta utilizando o imidazol e sua preparação consistiu em diluir 1,0 mL da amostra com água ultrapurificada para um volume final de 5,0 mL (balão volumétrico). O eletroferograma resultante dessa análise pode ser visto na Figura 72.

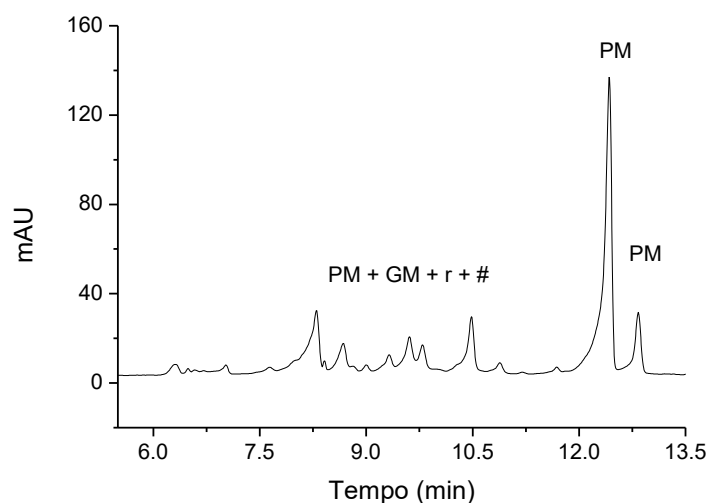
**Figura 72.** Eletroferograma da análise do sobrenadante pelo método de detecção indireta



Legenda: eletroferograma do sobrenadante resultante da obtenção das MS. Eletrólito 30 mmol L<sup>-1</sup> de imidazol pH 2,5. Temperatura de 29 °C. Tensão: 11 kV. Injeção 30 mbar x 7s. Capilar de 75 µm d. i. x 58,5 cm de comprimento total (50 cm de comprimento efetivo). Detecção: 400: 214 nm. Identificação dos picos: (#) pico desconhecido Fonte: elaborado pelo autor.

De acordo com figura 72, não foi possível quantificar os AG nessa matriz, pois a presença de um pico, provavelmente sódio, encobre os picos referentes à PM e à GM.

Uma alternativa para avaliar a eficiência de encapsulamento foi utilizar o método do OPA (Figura 73). O procedimento de derivatização da amostra foi feito de acordo com o descrito no item 3.3.2.5, o mesmo que foi utilizado para as análises das amostras farmacêuticas. Com base no eletroferograma, foi possível observar a presença dos AGs na solução do sobrenadante, o que evidencia que a eficiência de encapsulação foi baixa. Os testes do sobrenadante com o método padrão da ninidrina corrobora os resultados encontrados para o método do OPA. Quando o sobrenadante foi analisado por esse método, a concentração total de AG foi de 571,2 mg L<sup>-1</sup>, que corresponde, aproximadamente, à massa de AG colocada no início da encapsulação (20,0 mg), demonstrando que o encapsulamento dos AG nas MS foi insatisfatório.

**Figura 73.** Eletroferograma da análise do sobrenadante pelo método do OPA

Legenda: eletroferograma do sobrenadante resultante da obtenção das MS. Condições: Eletrólito 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS contendo 3 mmol L<sup>-1</sup> de β-CD e 15,5% de MeOH, pH 9,0. Temperatura: 23 °C. Tensão: 16 kV. Injeção: 50 mbar x 5 s. Capilar de 75 μm d.i x 40 cm de comprimento total (31,5 cm de comprimento efetivo). Detecção: 230 nm. Identificação dos picos:(GM): gentamicina (PM): paromomicina, (r): reagente, (#) desconhecido. Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.3.2. Perfil de Liberação

Para o teste do perfil de liberação da amostra das MS de PLGA contendo PM e GM foi utilizado o método utilizando OPA. Além disso, para estabelecer maior segurança na quantificação dos AG, esse método foi comparado com o método espectrofotométrico utilizando a ninidrina (item 3.3.1.8 e 3.3.2.5). Como este último método é incapaz de separar os AG, foi elaborada uma curva de calibração com a mistura de PM e GM na mesma proporção inserida dentro das microesferas, sendo possível assim quantificar a presença de AG totais na mistura.

As análises de ambos os métodos indicaram a presença de AG somente nos dois primeiros pontos (3 horas e 6 horas) de liberação. Para o método da ninidrina, o valor obtido foi de 30,0 mg L<sup>-1</sup> de AG totais (sulfato) no primeiro ponto, porém, no segundo ponto o valor estava abaixo do LOD. Já para o método do OPA, os valores de GM estavam abaixo do LOQ para todos os pontos e, no ponto 1, o valor de sulfato de PM foi de 1,6 mg L<sup>-1</sup>. Esses resultados, apesar da diferença na concentração, sugerem ineficiência de encapsulação da PM e GM com o protocolo 04 do método

proposto por Moura e colaboradores (2005), pois quase todo fármaco que foi efetivamente encapsulado foi liberado após 6 horas de teste.

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foram desenvolvidas e validadas duas metodologias alternativas para a determinação de AGs em amostras farmacêuticas. O método indireto mostrou maior simplicidade de execução e menor tempo de análise em relação aos métodos disponíveis na literatura. Dos protocolos selecionados para a síntese das microesferas, apenas um deles proporcionou resultados satisfatórios, porém com baixa capacidade de encapsulamento dos fármacos.

Foi feita a avaliação de diferentes agentes derivatizantes (DNS, MBSC, FMOC-Cl, NQS, PITC e OPA) para separação e quantificação de GM e PM, de forma simultânea, utilizando a CE-DAD. Entre os derivatizantes testados, o DNS, o FMOC-Cl e o NQS se apresentaram inviáveis para esse objetivo, devido à impossibilidade de separação entre GM e PM. No entanto, os métodos utilizando como agentes derivatizantes o PITC e o MBSC mostraram-se promissores para estudos futuros. Apesar de o método com MBSC não apresentar um aduto formado com a PM, ele possui potencial para quantificação de outros AG, como por exemplo a GM que foi quantificada.

Além dos testes com derivatizantes, foi avaliado o uso da detecção indireta, utilizando imidazol para a separação e quantificação de GM e PM. Esse método apresentou desempenho satisfatório em relação aos parâmetros de validação, sendo aplicado com sucesso para a análise de amostras farmacêuticas comerciais e para o sistema de liberação controlada simulado no laboratório. O método do OPA apresentou resultados de validação concordantes com os descritos por outros autores e foi aplicado com sucesso para a determinação de AG em amostras farmacêuticas e para o sistema de liberação simulado.

Com relação à síntese das microesferas de PLGA encapsuladas com PM e GM, foram avaliados quatro diferentes protocolos. O protocolo que apresentou melhor resultado, em termos de reprodutibilidade no laboratório, foi caracterizado quanto à forma geométrica, eficiência e perfil de liberação. Apesar de as microesferas terem sido sintetizadas com sucesso, os testes de liberação mostraram ineficiência de encapsulamento dos AGs quando avaliados pelo método do OPA. Ao comparar os resultados obtidos com o método padrão espectrofotométrico utilizando a ninidrina, observou-se que a eficiência de encapsulação desses fármacos a partir do protocolo selecionado foi insatisfatória. O método de detecção indireta mostrou resultados

insatisfatórios no procedimento de quantificação das amostras resultantes do processo de obtenção das microesferas, já que houve um efeito de matriz, ocasionado pela presença de íons sódio no meio (matriz contendo PVA, NaCl, água e AG).

Considerando futuras possibilidades de estudo, seria interessante a validação do método utilizando PITC para a separação de PM e GM, além de novas pesquisas e testes que possa levar à identificação de outros agentes derivatizantes compatíveis com técnica (CE-DAD).

Quanto ao cenário de baixa eficiência de encapsulamento de PM e GM, recomenda-se o uso de diferentes metodologias para a obtenção das MS como, por exemplo, a técnica de *spray-drying*, que consiste na produção de gotículas por meio da aspersão de uma mistura no interior de uma câmara de secagem.

## Referências

- ABDELGHANY, Sharif et al. Alginate modified-PLGA nanoparticles entrapping amikacin and moxifloxacin as a novel host-directed therapy for multidrug-resistant tuberculosis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 52, p. 642-651, 2019.
- ACKERMANS, M. T.; EVERAERTS, F. M.; BECKERS, J. L. Determination of aminoglycoside antibiotics in pharmaceuticals by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection coupled with micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 606, n. 2, p. 228-235, 1992.
- ALEMAYEHU, Bereket; ALEMAYEHU, Mihiretu. Leishmaniasis: a review on parasite, vector and reservoir host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 1, 2017.
- ALMEIDA, Eduardo Vinícius Silva; WAGNER, Ricardo. Análise da concentração de gentamicina comercializada nas farmácias de Curitiba-PR. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 2, n. 12, 2014.
- ALTRIA, Kevin D. (Ed.). **Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation, and applications**. Springer Science & Business Media, 1996.
- ALTRIA, Kevin D. **Analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis**. Springer Science & Business Media, 1998.
- ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, 2012.
- AN, Isa et al. The effect of pentavalent antimonial compounds used in the treatment of cutaneous leishmaniasis on hemogram and biochemical parameters. **Cutaneous and ocular toxicology**, v. 38, n. 3, p. 294-297, 2019.
- ANDRADE, Bruno B. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar: fatos, falácias e perspectivas. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 74, n. 1, 2008.
- ANVISA, Resolução RE. nº 899, de 29 de maio de 2003-. **A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bio-analíticos**. **Diário Oficial da União**, 2003.
- ANWER, Md Khalid et al. Development and evaluation of PLGA polymer based



nanoparticles of quercetin. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 213-219, 2016.

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. Wiley ed. New York, Wiley, 1995.

BARBANTI, Samuel H.; ZAVAGLIA, Cecília AC; DUEK, Eliana AR. Degradação acelerada de suportes de poli (épsilon-caprolactona) e poli (D, L-ácido láctico-co-ácido glicólico) em meio alcalino. **Polímeros**, v. 16, n. 2, p. 141-148, 2006.

BARBANTI, Samuel H.; ZAVAGLIA, Cecília AC; DUEK, Eliana AR. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BARRETT, Michael P.; CROFT, Simon L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British medical bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175-196, 2012.

BASTO, S. R. L. et al. Emulsão e microemulsão: novos sistemas de liberação controlada. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 10, n. 1-4, p. 25-33, 2017.

BATES, Paul A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BENEDEK, Kálmán; GUTTMAN, András. High performance capillary electrophoresis: an overview. **HPLC: Practical and Industrial Applications**, p. 385, 2000.

BHATTACHARYA, R.; MUKHOPADHYAY, S.; KOTHIYAL, P. Review on microemulsion-as a potential novel drug delivery system. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 6, 2016.

BIZERRA, Alex; SILVA, Viviane. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016.

BRANCO FILIPPIN, Fabíola; SOUZA, Liliete Canes. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

BRASIL, M. da S. **Óbitos de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000-2018**. Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/14/LV-Obitos.pdf>>

\_\_\_\_\_. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões**

**e Unidades Federadas. 1990 a 2018.** Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/14/LV-Casos.pdf>>.

BUCHANAN, J. H. et al. Intracellular accumulation of a fluorescent derivative of paromomycin in human fibroblasts. **Journal of cellular biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 71-80, 1982.

CANEVAROLO, J. R.; DOS POLÍMEROS, SV Ciência. Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 3ª edição. **São Paulo: Artliber**, 2010.

CARTER, Andrew P. et al. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 340-348, 2000.

CAVALIER, M.; BENOIT, J. P.; THIES, C. The formation and characterization of hydrocortisone-loaded poly ((±)-lactide) microspheres. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 38, n. 4, p. 249-253, 1986.

CHAISRI, Wasana et al. Enhanced gentamicin loading and release of PLGA and PLHMGA microspheres by varying the formulation parameters. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 2, p. 508-514, 2011.

CHAMPION, Julie A.; WALKER, Amanda; MITRAGOTRI, Samir. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 8, p. 1815-1821, 2008.

CHANDNA, Amit et al. A review on target drug delivery: magnetic microspheres. **Journal of acute disease**, v. 2, n. 3, p. 189-195, 2013.

CHANG, Xiaojuan; YU, Zhengping. Determination of etimicin in rat plasma using 9-fluorenylmethyl chloroformate precolumn derivatization by HPLC with fluorescence detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 1246-1252, 2011.

CHRISTEN, Jacques-Robert et al. Use of the intramuscular route to administer pentamidine isethionate in *Leishmania guyanensis* cutaneous leishmaniasis increases the risk of treatment failure. **Travel medicine and infectious disease**, v. 24, p. 31-36, 2018.

CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima; ALVES, Carlos Roberto (Ed.). **Leishmanioses do**

**continente americano**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2014.

CORREIA, Carolina Jacinto et al. Optimization of the encapsulation efficiency of a novel oral insulin delivery nanosystem. 2014.

COUNCIL OF EUROPE. European Pharmacopoeia 5.0. **Council of Europe**, 2004.

CUNHA, Mirella A. et al. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B for the treatment of mucosal leishmaniasis from the new world: a retrospective study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 6, p. 1214-1218, 2015.

CURIEL, Harold et al. Analysis of underivatized gentamicin by capillary electrophoresis with UV detection. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 44, n. 1, p. 49-56, 2007.

DA COSTA FILHO, Arnaldo Velloso da; LUCAS, Íris Campos; SAMPAIO, Raimunda Nonata Ribeiro. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 424-427, 2008.

DANHIER, Fabienne et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. **Journal of controlled release**, v. 161, n. 2, p. 505-522, 2012.

DAS, Samir et al. Miltefosine loaded albumin microparticles for treatment of visceral leishmaniasis: formulation development and in vitro evaluation. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 22, n. 1, p. 172-179, 2011.

DAVISON, Lisa et al. Low temperature gamma sterilization of a bioresorbable polymer, PLGA. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 143, p. 27-32, 2018.

DING, Dawei; ZHU, Qingdi. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. **Materials Science and Engineering: C**, v. 92, p. 1041-1060, 2018.

DIOTALLEVI, Aurora et al. Real-time PCR to differentiate among *Leishmania (Viannia)* subgenus, *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Application on Brazilian clinical samples. **Acta tropica**, v. 201, p. 105178, 2020.

- DRUGBANK. **Gentamicin**. Disponível em .<<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00798>>. Acesso em 06 abril 2020.
- DRUGBANK. **Paromomycin**. Disponível em .<<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01421>>. Acesso em 06 abril 2020.
- EID, Daniel et al. Risk factors for cutaneous leishmaniasis in the rainforest of Bolivia: a cross-sectional study. **Tropical medicine and health**, v. 46, n. 1, p. 9, 2018.
- EL-ON, Joseph et al. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of investigative dermatology**, v. 87, n. 2, p. 284-288, 1986.
- ELBASHIR, Abdalla Ahmed et al. 1, 2-Naphthoquinone-4-sulphonic acid sodium salt (NQS) as an analytical reagent for the determination of pharmaceutical amine by spectrophotometry. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 47, n. 3, p. 219-232, 2012.
- EVENHUIS, Christopher J.; HADDAD, Paul R. Joule heating effects and the experimental determination of temperature during CE. **Electrophoresis**, v. 30, n. 5, p. 897-909, 2009.
- FALCI, Diego Rodrigues; PASQUALOTTO, Alessandro Comaru. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical & Biomedical Research**, v. 35, n. 2, 2015.
- FAROUK, Faten; AZZAZY, Hassan ME; NIESSEN, Wilfried MA. Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. **Analytica chimica acta**, v. 890, p. 21-43, 2015.
- FERNANDES, Ane Josana Dantas; CORREIA, Liz Jully Hiluey. Fosfatos de cálcio mesoporosos para liberação controlada de fármacos. **Revista Principia**, n. 28, p. 78–91, 2015
- FIORANTI, Carlos. Um parasita chega às metrópoles. **Revista FAPESP**, São Paulo, 268, junho de 2018.
- FLORES, Claudia et al. Gentamicin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles for the prevention of maxillofacial and orthopedic implant infections. **Materials Science and Engineering: C**, v. 64, p. 108-116, 2016.
- FLURER, Cheryl L. The analysis of aminoglycoside antibiotics by capillary

electrophoresis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 13, n. 7, p. 809-816, 1995.

FLURER, Cheryl L.; WOLNIK, Karen A. Quantitation of gentamicin sulfate in injectable solutions by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 663, n. 2, p. 259-263, 1994.

FORGE, Andrew; SCHACHT, Jochen. Aminoglycoside antibiotics. **Audiology and Neurotology**, v. 5, n. 1, p. 3-22, 2000.

FOURMY, Dominique et al. Structure of the A site of Escherichia coli 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. **Science**, v. 274, n. 5291, p. 1367-1371, 1996.

FRENZ, John; HANCOCK, William S. High performance capillary electrophoresis. **Trends in biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 243-250, 1991.

FRUTOS, P. et al. A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 21, n. 6, p. 1149-1159, 2000.

GRACIA, E. et al. Improvement of PLGA loading and release of curcumin by supercritical technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 141, p. 60-67, 2018.

GUBERNATOR, Jerzy; DRULIS-KAWA, Zuzanna; KOZUBEK, Arkadiusz. A simply and sensitive fluorometric method for determination of gentamicin in liposomal suspensions. **International journal of pharmaceutics**, v. 327, n. 1-2, p. 104-109, 2006.

GUPTA, Rahul. **Where do I start with encapsulation of hydrophobic drug into PLGA microspheres?** Disponível em:

<[https://www.researchgate.net/post/Where\\_do\\_I\\_start\\_with\\_encapsulation\\_of\\_hydrophobic\\_drug\\_into\\_PLGA\\_microspheres](https://www.researchgate.net/post/Where_do_I_start_with_encapsulation_of_hydrophobic_drug_into_PLGA_microspheres)> Acesso em 06 abril 2020.

HE, Lin et al. Interfacial sciences in unconventional petroleum production: from fundamentals to applications. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 15, p. 5446-5494, 2015.

HE, Lili et al. Simultaneous determination of aliphatic, aromatic and heterocyclic biogenic amines without derivatization by capillary electrophoresis and application in

beer analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1482, p. 109-114, 2017.

HERRERA, Giovanni et al. Evaluation of four rapid diagnostic tests for canine and human visceral Leishmaniasis in Colombia. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 747, 2019.

HIROTA, Keiji et al. Optimum conditions for efficient phagocytosis of rifampicin-loaded PLGA microspheres by alveolar macrophages. **Journal of controlled release**, v. 119, n. 1, p. 69-76, 2007.

HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de análise instrumental**. Bookman, 2009.

HOLZGRABE, Ulrike; SCHMITT, Stefanie; WIENEN, Frank. Micellar Electrokinetic Chromatography of Aminoglycosides. In: **Capillary Electrophoresis**. Humana Press, New York, NY, 2016. p. 77-90.

HUBER, Ludwig. **Validation and qualification in analytical laboratories**. CRC Press, 2007.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.

ISMAIL, Harun et al. High initial burst release of gentamicin formulated as PLGA microspheres implant for treating orthopaedic infection. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci**, v. 4, p. 685-691, 2012.

ISMAIL, Ahmad Fahmi Harun et al. Spectrophotometric determination of gentamicin loaded PLGA microparticles and method validation via ninhydrin-gentamicin complex as a rapid quantification approach. **J. Appl. Pharm. Sci**, v. 6, n. 1, p. 007-014, 2016.

JAGER, Alessandra V.; TAVARES, Marina FM. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: Fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

JAIN, Keerti; JAIN, Narendra K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. **Drug discovery today**, v. 18, n. 23-24, p. 1272-1281, 2013.

JIANG, Meiyang; KARASAWA, Takatoshi; STEYGER, Peter S. Aminoglycoside-

induced cochleotoxicity: a review. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 11, p. 308, 2017.

JING, F. U. et al. Preparation and physicochemical characterization of T-OA PLGA microspheres. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 12, p. 912–916, 2017.

KAALE, Eliangiringa et al. Capillary Electrophoresis analysis of gentamicin sulphate with UV detection after pre-capillary derivatization with 1, 2-phthalic dicarboxaldehyde and mercaptoacetic acid. **Journal of Chromatography A**, v. 895, n. 1-2, p. 67-79, 2000.

KAALE, Eliangiringa et al. Development and validation of a simple capillary zone electrophoresis method for the analysis of kanamycin sulfate with UV detection after pre-capillary derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 924, n. 1-2, p. 451-458, 2001.

KAALE, Eliangiringa et al. Development and validation of capillary electrophoresis method for tobramycin with precapillary derivatization and UV detection. **Electrophoresis**, v. 23, n. 11, p. 1695-1701, 2002.

KAALE, Eliangiringa et al. Gentamicin assay in human serum by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 26, n. 3, p. 640-647, 2005.

KAMAREI, Fahimeh; EBRAHIMZADEH, Homeira; ASGHARINEZHAD, Ali Akbar. Optimization of simultaneous derivatization and extraction of aliphatic amines in water samples with dispersive liquid–liquid microextraction followed by HPLC. **Journal of separation science**, v. 34, n. 19, p. 2719-2725, 2011.

KHAN, Wahid; KUMAR, Neeraj. Characterization, thermal stability studies, and analytical method development of Paromomycin for formulation development. **Drug testing and analysis**, v. 3, n. 6, p. 363-372, 2011.

KHATRI, Pinak et al. Role of plasticizer in membrane coated extended release oral drug delivery system. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 44, p. 231-243, 2018.

KREUTNER, A. Karen; DEL BENE, Victor E.; AMSTEY, Marvin S. Giardiasis in

pregnancy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 140, n. 8, p. 895-901, 1981.

KÜHN, K.-D. et al. Evaluation of the stability of gentamicin in different antibiotic carriers using a validated MEKC method. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 48, n. 3, p. 612-618, 2008.

KUMARI, Avnesh; YADAV, Sudesh Kumar; YADAV, Subhash C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces B: biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

LANÇAS, Fernando M. et al. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LANDERS, James P. **Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**. CRC press, 2007.

LANGER, Robert et al. Drug delivery and targeting. **NATURE-LONDON-**, p. 5-10, 1998.

LANGER, R. S.; PEPPAS, Nicholas A. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. **Biomaterials**, v. 2, n. 4, p. 201-214, 1981.

LARSEN, Niels-Erik; MARINELLI, Karin; HEILESEN, Aina Møller. Determination of gentamicin in serum using liquid column chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 221, n. 1, p. 182-187, 1980.

LI, Jing et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, v. 10, n. 2, p. 81-98, 2014.

LIN, Yi-Fang; WANG, Yung-Chi; CHANG, Sarah Y. Capillary electrophoresis of aminoglycosides with argon-ion laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1188, n. 2, p. 331-333, 2008.

LIU, Y. et al. Development and Validation of a Liquid Chromatography Method for the Analysis of Paromomycin Sulfate and its Impurities. **J Anal Bioanal Techniques**, v. 1, n. 102, p. 2, 2010.



LUZ, João Gabriel Guimarães et al. Are backyard characteristics relevant factors for the occurrence of human visceral leishmaniasis in Central-Western Brazil?. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 114, n. 4, p. 276-283, 2020.

MANTOANELLI, Jéssica. O. F. **Determinação de aminas biogênicas em amostras de alimentos utilizando a eletroforese capilar**. 2019. Universidade Federal de São Carlos, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jag.2018.07.004><http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-25369-w>>.

MARTINEZ, Roberto. An update on the use of antifungal agents. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. **Brasília-DF: Ministério da Saúde, Brasil**, p. 71, 2007.

MOHAMMADI-SAMANI, Soliman; TAGHIPOUR, Behzad. PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; problems and approaches. **Pharmaceutical development and technology**, v. 20, n. 4, p. 385-393, 2015.

MOHAMMADZADEH Kakhki, R.; ASSADI, H. Capillary electrophoresis analysis based on crown ethers. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 81, n. 1-2, p. 1-12, 2014.

MOMENI, Arash et al. Development of liposomes loaded with anti-leishmanial drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of liposome research**, v. 23, n. 2, p. 134-144, 2013.

MORAIS, W. D. A. **Desenvolvimento e caracterização de microesferas contendo trans-desidroacetonina**. 2010. Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

MORENO-GONZÁLEZ, David et al. Determination of aminoglycosides in honey by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry and extraction with molecularly imprinted polymers. **Analytica chimica acta**, v. 891, p. 321-328, 2015.

MOTTA, Adriana C.; DUEK, Eliana AR. Síntese, caracterização e degradação" in vitro" do Poli (L-ácido láctico). **Polímeros**, v. 16, n. 1, p. 26-32, 2006.

MOURA, Lucas Alves et al. Characterization of the release profile of doxycycline by PLGA microspheres adjunct to non-surgical periodontal therapy. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 26, n. 10, p. 573-584, 2015.

NAVARRO-PASCUAL-AHUIR, María et al. Analysis of Aliphatic Organic Acids in Commercial Fruit Juices by Capillary Electrophoresis with Indirect UV Detection: Application to Differentiation of Fruit Juices. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 12, p. 3991-4002, 2017.

OLIVEIRA, Rosângela Ziggotti et al. Leishmaniose tegumentar americana no município de Jussara, estado do Paraná, Brasil: série histórica de 21 anos. **Espaço para Saúde**, v. 17, n. 2, p. 59-65, 2016.

OLIVEIRA, João Fernando P.; CIPULLO, José Paulo; BURDMANN, Emmanuel A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 21, n. 4, p. 444-452, 2006.

OLIVEIRA, Luiz F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta tropica**, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas O. **Informe de Leishmanioses**, 2019. Disponível em: < <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=y> > Acesso em 06 abril 2020.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, P, Organisation. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas [Internet]. **Washington (DC). Washington (DC): OPS**, 2019.

OTSUKA, K.; TERABE, S. Micellar Electrokinetic Chromatography. **Bull. Chem. Soc. Jpn**, v. 71, 1998.

PASTORE, Paolo; GALLINA, Albino; MAGNO, Franco. Description and validation of an analytical method for the determination of paromomycin sulfate in medicated animal feeds. **Analyst**, v. 125, n. 11, p. 1955-1958, 2000.

PEDROSO, T. M., SCHEPDAEL, A. V., & SALGADO, H. R. N. (2019). Application of the principles of green chemistry for the development of a new and sensitive method for analysis of ertapenem sodium by capillary electrophoresis. **International journal**

**of analytical chemistry**, 2019.

PEREIRA, Elisabete A.; TAVARES, Marina FM. Determination of volatile corrosion inhibitors by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1051, n. 1-2, p. 303-308, 2004.

PETRI JR, William A. Therapy of intestinal protozoa. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 11, p. 523-526, 2003.

PIGOTT, David M. et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. **Elife**, v. 3, p. e02851, 2014.

PIMENTA, Paulo Filemon Paolucci; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, Nágila Francinete Costa. A Interação do Protozoário Leishmania com seus Insetos Vetores. **Tópicos avançados em entomologia molecular. Cap**, v. 12, p. 1-45, 2012.

PORTNA, K. P. et al. Spectrophotometric determination amikacin in reaction with 1, 2-naphthoquinone-4-sulfonic acid sodium salt. **Int. J. Curr.Res.Chem.Pharma.Sci**, v. 2, n. 4, p. 15–18, 2015.

POSADOWSKA, Urszula; BRZYCHCZY-WŁOCH, Monika; PAMUŁA, Elżbieta. Gentamicin loaded PLGA nanoparticles as local drug delivery system for the osteomyelitis treatment. **Acta of bioengineering and biomechanics**, v. 17, n. 3, 2015.

PRAUSNITZ, Mark R.; LANGER, Robert. Transdermal drug delivery. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1261, 2008.

PUROHIT, Kapil; GARUD, Navneet. Formulation and evaluation of floating microspheres of losartan potassium using sodium alginate and HPMC by solvent evaporation method. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 1-s, p. 60-66, 2019.

QI, Fuwei et al. MEKC-LIF for Sensitive Discrimination of Six Potential Risk Predictors for Auxiliary Diagnosis of Anesthesia Complications in Clinical Urine Fluids. **Chromatographia**, v. 79, n. 23-24, p. 1665-1670, 2017.

RAMIREZ, Maria S.; TOLMASKY, Marcelo E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151-171, 2011.

RAO, Shasha; PRESTIDGE, Clive A. Polymer-lipid hybrid systems: merging the benefits of polymeric and lipid-based nanocarriers to improve oral drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 13, n. 5, p. 691-707, 2016.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIEKKOLA, M. Micellar Electrokinetic Chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, p. 1280–1286, 2000.

ROJAS-JAIMES, Jesús et al. Leishmania species in biopsies of patients with different clinical manifestations identified by high resolution melting and nested PCR in an Endemic district in Peru. **Parasite epidemiology and control**, v. 4, p. e00095, 2019.

SALAH, Afif Ben et al. WR279, 396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of Leishmania major cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 5, 2009.

SAMPATH, Suchitra S.; ROBINSON, Dennis H. Comparison of new and existing spectrophotometric methods for the analysis of tobramycin and other aminoglycosides. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 79, n. 5, p. 428-431, 1989.

SANTOS, Lúcia F. et al. Biomaterials for drug delivery patches. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 118, p. 49-66, 2018.

SANTOS, Marconi Eduardo Sousa Maciel et al. Leishmaniose mucocutânea facial: desafios do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Bucod-maxilo-facial**, v. 13, n. 2, p. 15-21, 2013.

SANTOS, P. **Síntese de micro/nanopartículas de óxido de cálcio por queima de alginato usando via verde**. 2018. Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, 2018. Disponível em:

<[>](https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/186602/PPAU0156-D.pdf?sequence=-1&isAllowed=y%0Ahttp://journal.stainkudus.ac.id/index.php/equilibrium/article/view/1268/1127%0Ahttp://www.scielo.br/pdf/rae/v45n1/v45n1a08%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.></a></p></div><div data-bbox=)

SANTUCCI, RICHARD A.; KRIEGER, JOHN N. Gentamicin for the practicing urologist: review of efficacy, single daily dosing and “switch” therapy. **The Journal of urology**, v. 163, n. 4, p. 1076-1084, 2000.

SAZ, J. M.; MARINA, M. L. Recent advances on the use of cyclodextrins in the chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1467, p. 79-94, 2016.

SERRANO, Juan Manuel; SILVA, Manuel. Trace analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine milk by MEKC with LIF detection. **Electrophoresis**, v. 27, n. 23, p. 4703-4710, 2006.

SHIRZADI, Mohammad Reza. Liposomal amphotericin B: a review of its properties, function, and use for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Research and reports in tropical medicine**, v. 10, p. 11, 2019.

SILVA, Catarina et al. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 1-20, 2003.

SMALL, Gary; DUBOIS, Bruno. A review of compliance to treatment in Alzheimer's disease: potential benefits of a transdermal patch. **Current medical research and opinion**, v. 23, n. 11, p. 2705-2713, 2007.

SOARES-BEZERRA, Rômulo José; LEON, Leonor; GENESTRA, Marcelo. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

SOLOMON, Michal; SCHWARTZ, Eli. Cutaneous Leishmaniasis. In: **Gender and Dermatology**. Springer, Cham, 2018. p. 227-234.

SRISOM, Piyaporn et al. Simultaneous determination of neomycin sulfate and polymyxin B sulfate by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 43, n. 3, p. 1013-1018, 2007.

SRISUNG, Weeraporn et al. Surgical prophylaxis with gentamicin and acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **Annals of translational medicine**, v. 5, n. 5, 2017.

SRIVASTAVA, Saumya et al. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 49, 2017.

PIERRE, Laurie A. St; SENTELL, Karen B. Cyclodextrins as enantioselective mobile phase modifiers for chiral capillary electrophoresis Effects of pH and cyclodextrin concentration. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 657, n. 2, p. 291-300, 1994.

STEAD, David A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 747, n. 1-2, p. 69-93, 2000.

STEAD, D. A.; RICHARDS, R. M. E. Sensitive fluorimetric determination of gentamicin sulfate in biological matrices using solid-phase extraction, pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 675, n. 2, p. 295-302, 1996.

STYPULKOWSKA, K. et al. Determination of neomycin and related substances in pharmaceutical preparations by reversed-phase high performance liquid chromatography with mass spectrometry and charged aerosol detection. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 76, p. 207-214, 2013.

SUN, Yujie et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by LC using a new labeling reagent, 4-methoxybenzenesulfonyl fluoride. **Chromatographia**, v. 72, n. 7-8, p. 679-686, 2010.

SUNDAR, Shyam et al. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 25, p. 2571-2581, 2007.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 17, n. 5, p. 787-794, 2008.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya; MEENA, Lalit P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2019.

SWINNEY, Kelly; BORNHOP, Darryl J. Detection in capillary

electrophoresis. **ELECTROPHORESIS: An International Journal**, v. 21, n. 7, p. 1239-1250, 2000.

TABATA, Yasuhiko; IKADA, Yoshito. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. **Biomaterials**, v. 9, n. 4, p. 356-362, 1988.

TAVARES, Marina FM. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TERABE, Shigeru et al. Effect of urea addition in micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 545, n. 2, p. 359-368, 1991.

TERABE, Shigeru. Twenty-five years of micellar electrokinetic chromatography. **Procedia Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 2-8, 2010.

TIBBITT, Mark W.; DAHLMAN, James E.; LANGER, Robert. Emerging frontiers in drug delivery. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 3, p. 704-717, 2016.

TIWARI, Shashank; VERMA, Prerana. Microencapsulation technique by solvent evaporation method (Study of effect of process variables). **International journal of pharmacy & life sciences**, v. 2, n. 8, 2011.

UHRICH, Kathryn E. et al. Polymeric systems for controlled drug release. **Chemical reviews**, v. 99, n. 11, p. 3181-3198, 1999.

UNDERBERG, Willy JM; WATERVAL, Joop CM. Derivatization trends in capillary electrophoresis: an update. **Electrophoresis**, v. 23, n. 22-23, p. 3922-3933, 2002.

VAHER, Merike et al. Ionic liquids as background electrolyte additives and coating materials in capillary electrophoresis. In: **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Chemistry**. 2007.

VERT, M. et al. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **Journal of materials science: Materials in medicine**, v. 3, n. 6, p. 432-446, 1992.

VILLAREAL, M. R. **Leishmaniasis life cycle diagram**. Disponível em:  
<[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis\\_life\\_cycle\\_diagram\\_en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg)>  
Acesso em 06 abril 2020.

VOLPI, Nicola (Ed.). **Capillary electrophoresis of carbohydrates: from monosaccharides to complex polysaccharides**. Springer Science & Business Media, 2011.

VORTMANN-WESTHOVEN, Britta et al. Determination of lithium and transition metals in Li<sub>1</sub>Ni<sub>1/3</sub>Co<sub>1/3</sub>Mn<sub>1/3</sub>O<sub>2</sub> (NCM) cathode material for lithium-ion batteries by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 38, n. 3-4, p. 540-546, 2017.

WADE, L.G. **Organic Chemistry**. 8 ed. Person, 2013.

WAHL, Oliver; HOLZGRABE, Ulrike. Amino acid analysis for pharmacopoeial purposes. **Talanta**, v. 154, p. 150-163, 2016.

WAN, Leo Q. et al. Calcium concentration effects on the mechanical and biochemical properties of chondrocyte-alginate constructs. **Cellular and molecular bioengineering**, v. 1, n. 1, p. 93-102, 2008.

WANG, Y.; WEN, Q.; CHOI, S. FDA's regulatory science program for generic PLA/PLGA-based drug products. **Am Pharm Rev**, v. 19, n. 4, p. 5-9, 2017.

WEINBERGER, Robert. **Practical capillary electrophoresis**. Elsevier, 2000.

WHATLEY, Harry. Basic principles and modes of capillary electrophoresis. In: **Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis**. Humana Press, Totowa, NJ, 2001. p. 21-58.

WIENEN, F.; HOLZGRABE, U. Characterization of paromomycin sulfate by capillary electrophoresis with UV detection after pre-capillary derivatization. **Chromatographia**, v. 55, n. 5-6, p. 327-331, 2002.

WIENEN, Frank; HOLZGRABE, Ulrike. A new micellar electrokinetic capillary chromatography method for separation of the components of the aminoglycoside antibiotics. **Electrophoresis**, v. 24, n. 17, p. 2948-2957, 2003.

WU, Chunhung et al. Determination of critical micelle concentrations of ionic and nonionic surfactants based on relative viscosity measurements by capillary electrophoresis. **Research on Chemical Intermediates**, v. 40, n. 6, p. 2371-2379, 2014.

YANG, Bixia et al. Simultaneous determination of 11 aminoglycoside residues in



honey, milk, and pork by liquid chromatography with tandem mass spectrometry and molecularly imprinted polymer solid phase extraction. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 6, p. 1869-1878, 2017.

YU, Yue et al. Highly sensitive determination of aminoglycoside residues in food by sheathless CE-ESI-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 11, n. 39, p. 5064-5069, 2019.

YUAN, LingLing; WEI, HongPing; LI, Sam FY. Direct determination of gentamicin components by capillary electrophoresis with potential gradient detection. **Electrophoresis**, v. 26, n. 1, p. 196-201, 2005.

ZHANG, Ying; CHAN, Hon Fai; LEONG, Kam W. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 104-120, 2013.

ZHU, Yuanyuan; LIAO, Lianming. Applications of nanoparticles for anticancer drug delivery: a review. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 15, n. 7, p. 4753-4773, 2015.