

Célia Ferreira

**Caracterização por GC-MS de Glicídios
Derivatização Assistida por Microondas**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em
Química Forense**

Orientadora: Doutora Marta Piñeiro Gomez

Setembro 2011

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

À Professora Doutora Marta Piñeiro quero deixar expresso um agradecimento especial pela sua orientação e supervisão, pelos conhecimentos transmitidos, empenho e dedicação dispensados durante a realização deste estágio. Também pela sua amizade, constante disponibilidade, paciência e boa disposição. Muito obrigada por tudo.

À Doutora Sílvia Gramacho agradeço pela sua amizade, simpatia, apoio, disponibilidade e a realização dos GC-MS, um sincero obrigado.

À Doutora Alexandra Gonçalves gostaria de agradecer a disponibilidade, simpatia e a realização dos LC-MS-MS, o meu obrigado.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra agradeço a oportunidade concedida para a realização deste mestrado.

A todos os colegas do grupo de Química Orgânica, agradeço a amizade e companheirismo, de um modo particular à Amélia pelo seu incentivo e ajuda.

À minha família e amigos por todo o apoio incondicional, compreensão e carinho, que de alguma forma me apoiaram na realização deste mestrado. E por último, um especial agradecimento, ao meu marido, pela sua boa disposição que não há igual, pelo carinho, compreensão, dedicação e paciência, o meu mais sincero obrigado por tudo.

Índice

Índice de Esquemas.....	i
Índice de Figuras.....	ii
Índice de Tabelas.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Siglas e Abreviaturas.....	vii
Objectivos.....	ix
Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1. Hidratos de carbono.....	1
1.1.1. Monossacarídeos.....	3
1.1.1.1. Glucose.....	3
1.1.1.2. Galactose.....	5
1.1.1.3. Frutose.....	6
1.1.1.4. Ribose.....	6
1.1.2. Dissacarídeos.....	7
1.1.2.1. Sacarose.....	7
1.1.2.2. Lactose.....	8
1.1.2.3. Maltose.....	9
1.2. Antibióticos aminoglicosídeos.....	9
1.2.1. Origem.....	11
1.2.2. Estrutura química e suas características.....	11
1.2.3. Neomicina.....	12
1.2.4. Netilmicina.....	13
1.3. Métodos analíticos.....	14
1.3.1. Revisão da literatura.....	14
1.3.1.1. Hidratos de carbono.....	14
1.3.1.2. Antibióticos aminoglicosídeos.....	15
1.3.2. Cromatografia gasosa.....	17
1.3.2.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.....	18
1.3.3. Reacções de derivatização.....	21

1.3.3.1. Reacção de acetilação.....	21
1.3.3.2. Reacção de sililação	22
1.3.4. Derivatização acelerada por microondas.....	23
1.3.5. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial.....	25
1.3.6. Método de extracção em fase sólida (SPE).....	27
1.4. Estudos de estabilidade nos medicamentos	28
Capítulo 2 - Resultados e Discussão	30
2.1. Metodologia assistida por microondas: monossacarídeos e dissacarídeos	30
2.1.1. Monossacarídeos	31
2.1.2. Dissacarídeos.....	48
2.2. Metodologia assistida por microondas: antibióticos aminoglicosídeos.....	58
Capítulo 3 – Experimental.....	68
3.1. Instrumentação	68
3.2. Amostras, solventes e reagentes	71
3.3. Procedimento experimental.....	71
3.3.1. Metodologia assistida por microondas – Reacções de acetilação	71
3.3.1.1. Monossacarídeos	71
3.3.1.2. Dissacarídeos.....	72
3.3.2. Metodologia assistida por microondas – Reacções de sililação.....	73
3.3.2.1. Monossacarídeos	73
3.3.2.2. Dissacarídeos.....	73
3.3.2.3. Neomicina.....	74
3.3.2.4. Injectável de netilmicina.....	74
3.3.3. Estudos de degradação forçada em netilmicina	75
Capítulo 4 – Conclusão	76
Capítulo 5 – Bibliografia.....	78

Índice de Esquemas

Esquema 1 - Mecanismo geral da reacção de acetilação.	22
Esquema 2 - Mecanismo geral da reacção de sililação.	22
Esquema 3 - Reacção de acetilação da <i>D</i> -glucopiranosose com anidrido acético.	31
Esquema 4 - Reacção de sililação da <i>D</i> -glucopiranosose com BSTFA-TMCS.	34
Esquema 5 - Reacção de acetilação da <i>D</i> -galactose com anidrido acético.	37
Esquema 6 - Reacção de sililação da <i>D</i> -galactose com BSTFA-TMCS.	38
Esquema 7 - Reacção de acetilação da <i>D</i> -frutose com anidrido acético.	40
Esquema 8 - Reacção de sililação da <i>D</i> -frutose com BSTFA-TMCS.	43
Esquema 9 - Reacção de acetilação da <i>D</i> -ribose com anidrido acético.	45
Esquema 10 - Reacção de acetilação da sacarose com anidrido trifluoroacético.	49
Esquema 11 - Reacção de sililação da sacarose com BSTFA-TMCS.	50
Esquema 12 - Reacção de acetilação da lactose com anidrido acético.	52
Esquema 13 - Reacção de sililação da lactose com BSTFA-TMCS.	53
Esquema 14 - Reacção de acetilação da maltose com anidrido acético.	55
Esquema 15 - Reacção de sililação da maltose com BSTFA-TMCS.	56

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura molecular da <i>D</i> -glucose na forma de cadeia aberta e os seus respectivos anómeros α e β	4
Figura 2 - Estrutura molecular da <i>D</i> -galactose na forma de cadeia aberta e os seus respectivos anómeros α e β	5
Figura 3 - Estrutura molecular da <i>D</i> -frutose na cadeia aberta e os seus respectivos anómeros α e β	6
Figura 4 - Estrutura molecular da <i>D</i> -ribose na forma de cadeia aberta e os seus respectivos anómeros α e β	7
Figura 5 - Estrutura molecular da sacarose.....	8
Figura 6 - Estrutura molecular da β -lactose.....	8
Figura 7 - Estrutura molecular da α -maltose.....	9
Figura 8 - Estrutura da 2-deoxiestreptamina e estreptidina.....	11
Figura 9 - Estrutura química da neomicina B.....	12
Figura 10 - Estrutura química da netilmicina, sisomicina e 1- <i>N</i> -etil-garamina.....	13
Figura 11 - Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás.....	17
Figura 12 - Esquema de um sistema típico de GC-MS.....	19
Figura 13 - Derivatização acelerada por microondas.....	25
Figura 14 - Esquema de um sistema típico de LC-MS-MS.....	26
Figura 15 - Etapas do processo de extração em fase sólida.....	28
Figura 16 - Cromatograma da <i>D</i> -glucopiranosose acetilada analisada pelo método A.....	32
Figura 17 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 11,24 minutos para a α - <i>D</i> -glucopiranosose acetilada analisada pelo método A.....	32
Figura 18 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 11,93 minutos, para a β - <i>D</i> -glucopiranosose acetilada analisada pelo método A.....	33
Figura 19 - Cromatograma da <i>D</i> -glucopiranosose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.....	35
Figura 20 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 58,37 minutos, para a <i>D</i> -glucopiranosose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.....	36
Figura 21 - Cromatograma da <i>D</i> -galactopiranosose acetilada analisada pelo método B da técnica GC-MS.....	37
Figura 22 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção minutos, para a <i>D</i> -galactopiranosose acetilada analisada pelo método B da técnica GC-MS.....	37
Figura 23 - Cromatograma da <i>D</i> -galactopiranosose sililada com BSTFA-TMCS analisado pelo método B da técnica GC-MS.....	38
Figura 24 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 62,10 minutos, para a <i>D</i> -galactopiranosose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.....	39
Figura 25 - Espectro de RMN ^1H correspondente à frutose acetilada.....	40
Figura 26 - Espectro de RMN ^1H ampliado entre 3-6 ppm correspondente à frutose acetilada.....	40
Figura 27 - Cromatograma da frutose acetilada analisada pelo método A da técnica GC-MS.....	41
Figura 28 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 11,24 minutos, para a <i>D</i> -frutose acetilada analisada pelo método A da técnica GC-MS.....	42
Figura 29 - Cromatograma da <i>D</i> -frutose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.....	43
Figura 30 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 61,66 minutos para a α - <i>D</i> -frutofuranose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.....	44

Figura 31 - Espectro de massa RMN ¹ H correspondente à <i>D</i> -ribose acetilada.	45
Figura 32 - Espectro de RMN ¹ H ampliado entre 3-7 ppm correspondente à <i>D</i> -ribose acetilada.	46
Figura 33 - Cromatograma da <i>D</i> -ribose acetilada analisada pelo método A da técnica GC-MS.	46
Figura 34 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 10,39 minutos para a <i>D</i> -ribose acetilada analisada pelo método A da técnica GC-MS.	47
Figura 35 - Cromatograma da sacarose acetilada com anidrido trifluoroacético analisada pelo método B da técnica GC-MS.	49
Figura 36 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 76,77 minutos para a sacarose acetilada com anidrido trifluoroacético analisada pelo método B da técnica GC-MS.	50
Figura 37 - Cromatograma da sacarose sililada sujeita ao método B da técnica GC-MS.	51
Figura 38 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 80,10 minutos para a sacarose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.	51
Figura 39 - Cromatograma da lactose acetilada analisada pelo método B da técnica GC-MS.	52
Figura 40 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 65,69 minutos para a lactose acetilada analisada pelo método B da técnica GC-MS.	53
Figura 41 - Cromatograma da lactose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.	54
Figura 42 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 85,95 minutos para a lactose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.	54
Figura 43 - Cromatograma da maltose acetilada analisada pelo método B da técnica GC-MS.	55
Figura 44 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 65,86 minutos para a maltose acetilada analisada pelo método B da técnica GC-MS.	56
Figura 45 - Cromatograma da maltose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.	57
Figura 46 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 85,03 minutos para a maltose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.	57
Figura 47 - Estrutura molecular da neomicina sililada com as principais fragmentações.	59
Figura 48 - Cromatograma da neomicina sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.	59
Figura 49 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 65,57 minutos para a neomicina sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.	60
Figura 50 - Estrutura molecular da netilmicina sililada com as principais fragmentações.	61
Figura 51 - Cromatograma da netilmicina extraída sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.	62
Figura 52 - Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 76,88 minutos para a netilmicina extraída sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.	62
Figura 53 - Amostra de netilmicina em solução de tampão fosfato a uma temperatura de 50°C após 9 dias analisada por LC-MS-MS.	64
Figura 54 - Espectro de massa da netilmicina extraída sililada analisada pela técnica LC-MS-MS.	65
Figura 55 - Espectro de massa da netilmicina extraída sililada após 47 dias de degradação pela técnica LC-MS-MS.	65
Figura 56 - Espectro de massa da netilmicina extraída acetilada após 47 dias de degradação sujeita à técnica LC-MS-MS.	66

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais aminoglicosídeos, período em que foram descobertos e tipo de origem.....	10
Tabela 2 - Fragmentos iónicos das reacções de acetilação e sililação.	47

Resumo

Os hidratos de carbono e derivados são compostos orgânicos de elevada abundância na natureza, tendo um papel crucial em todos os seres vivos. O elevado número de grupos hidroxilo na sua estrutura e a ausência de grupos cromóforos limita a capacidade de análise por métodos cromatográficos tal como a cromatografia líquida de alta pressão com detector ultra-violeta ou a cromatografia gasosa de ampla utilização na indústria.

Nesta dissertação apresenta-se o desenvolvimento de uma metodologia de derivatização assistida por microondas que permita a análise deste tipo de compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. A aplicação da irradiação por microondas tem se revelado uma técnica simples e eficaz que permite obter o produto derivatizado em um minuto.

O estudo compreende o estabelecimento de métodos cromatográficos aplicáveis a derivados acetilados e sililados, que é posteriormente alargado para a sua utilização em dissacarídeos e aminoglicosídeos. A análise dos espectros de massa de dissacarídeos e aminoglicosídeos revelou a possibilidade de utilizar esta metodologia para identificar as unidades que constituem estas estruturas.

Palavras-chave: Açúcares, Aminoglicosídeos, MAD, GC-MS, LC-MS-MS

Abstract

Carbohydrates and their derivatives are organic compounds with high abundance in nature that play an important role in all living beings. However the high number of hydroxyl groups in the structure of the carbohydrates and the absence of chromospheres groups limits the applications of chromatographic methods, such as, high-pressure liquid chromatography with an ultraviolet detector or gas chromatography with industrial application.

In the present work we will developed a new methodology of microwave-assisted derivatization to allow the analysis of such compounds by gas chromatography-mass spectroscopy. The application of microwave irradiation, have proved a simple and effective technique which gives the product derivatized in a minute.

This study includes the establishment of chromatographic methods applicable to derivatives acetylated and silylated, which is later extended to its use in disaccharides and aminoglycosides. The mass spectra analysis of disaccharides and aminoglycosides revealed the possibility of using this methodology to identify the units that make up these structures.

Siglas e Abreviaturas

AC	Acetilo (COCH ₃)
BSTFA	<i>N-O</i> -Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
BSTFA-TMCS	<i>N-O</i> -Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano
CI	Ionização química (do inglês “chemical ionisation”)
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
EI	Ionização por impacto electrónico (do inglês “electronic impact”)
ε'	Constante dieléctrica
ε''	Perda dieléctrica
ESI¹	Do inglês “electrospray ionisation”
FAB	Ionização por bombardeamento com átomos rápidos (do inglês “fast-atom bombardment”)
GC¹	Cromatografia gasosa (do inglês “gas chromatography”)
GC-MS¹	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (do inglês “gas chromatography-mass spectrometry”)
HPLC¹	Cromatografia líquida de alta pressão (do inglês “high pressure liquid chromatography”)
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alta pressão com detector ultra-violeta
LC¹	Cromatografia líquida (do inglês “liquid chromatography”)
LC-MS¹	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (do inglês “liquid chromatography-mass spectrometry”)
LC-MS-MS¹	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial (do inglês “liquid chromatography-tandem mass spectrometry”)
MeOH	Metanol
MS¹	Espectrometria de massa (do inglês “mass spectrometry”)
M⁺	Ião molecular (na descrição dos espectros de massa)

MAD¹	Derivatização assistida por microondas (do inglês “Microwave-accelerated Derivatization”)
MSTFA	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -trifluoroacetamida
m/z	Relação massa/carga
SIM¹	Do inglês “single ion monitoring”
SRM¹	Do inglês “selected reaction monitoring”
SPE	Extracção em fase sólida
S_N2	Substituição nucleofílica bimolecular
TMCS	Trimetilclorosilano
TMS	Derivados trimetilsilil (Si(CH ₃) ₃)
TIC¹	Do inglês “total ion chromatogram”
TLC¹	Cromatografia em camada fina (do inglês “thin layer chromatography”)
TFA¹	Ácido trifluoroacético (do inglês “trifluoroacetic acid”)
u.m.a.	Unidades de massa atómica
UV	Ultra-violeta

Na descrição dos espectros de ressonância magnética nuclear utilizaram-se as seguintes abreviaturas:

RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear protónica
d	Dubleto
Hz	Hertz
m	Multipleteo
ppm	Partes por milhão
s	Singleto
t	Tripleteo
δ	Desvio químico

¹Adoptaram-se ao longo desta dissertação abreviatura dos tempos anglicizados para facilidade de leitura

Objectivos

Desenvolver uma metodologia célere e eficaz de derivatização assistida por microondas que permita a análise de açúcares por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Desenvolvimento do método cromatográfico que permita a análise de derivados de açúcares.

Alargamento da metodologia a glícidos de elevado peso molecular.

Aplicação na análise de fármacos glicosídeos.

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Hidratos de carbono

O termo hidratos de carbono provém do francês, *hydrate de carbon*, tendo sido aplicado no princípio do século XIX. Conhecidos, também, por sacáridos, são compostos que possuem a fórmula empírica geral de $C_n(H_2O)_n$, em que n é um número compreendido entre 3 e 6. São transformados nas plantas por fotossíntese e encontram-se em diversos alimentos naturais, tais como grão, cereais, cana-de-açúcar, fruta, leite e mel. Têm um papel crucial em todos os seres vivos, proporcionando energia química necessária para as funções corporais, exercício muscular, temperatura corporal, digestão e assimilação de nutrientes, entre outros. Os hidratos de carbono, especialmente a glucose, são a principal fonte de energia para o cérebro e sistema nervoso.

Os hidratos de carbono são classificados de acordo com o seu tamanho. O termo açúcar aplica-se a monossacarídeos ou oligossacarídeos de baixa massa molecular. Os monossacarídeos contêm uma simples unidade de açúcar. Enquanto os oligossacarídeos, são formados por duas a dez unidades de monossacarídeos, unidos por ligações

glicosídicas. De acordo, como o número de unidades de açúcar, classificam-se de dissacarídeos, trissacarídeos, etc. A distinção relativamente aos polissacarídeos não é muito nítida, no entanto o termo oligossacarídeo designa uma estrutura definida, enquanto polissacarídeo é utilizado para polímeros com cadeias de comprimento não especificado, sendo considerados os hidratos de carbono mais complexos¹.

O estudo da análise química dos hidratos de carbono têm vindo cada vez mais a despertar o interesse na comunidade científica em diversas áreas, nomeadamente na indústria alimentar, farmacêutica, amostras ambientais e amostras clínicas^{2,3,4,5}.

Os hidratos de carbono fazem parte da constituição de vários organismos terrestres e marinhos, representando uma das principais formas fotossintéticas de carbono assimilado na biosfera. Assim, são elementos essenciais na elucidação de processos biologicamente importantes em materiais orgânicos e ambientes naturais. Os açúcares são responsáveis por cerca de 50% da matéria orgânica vegetal que entra no solo. Sendo metabolizados rapidamente pela biomassa microbiana do solo².

Na indústria alimentar, a análise do teor de açúcares tem um papel fundamental no controlo da qualidade dos alimentos e das bebidas. Cada vez mais o excesso de consumo de açúcar tem-se revelado prejudicial, provocando diversas doenças, mais precisamente diabetes e obesidade. Dando lugar a um aumento no interesse de monitorizar os níveis destes açúcares nas mais variadas matrizes biológicas, nomeadamente, sangue, saliva e plasma.

Alguns exemplos são os artigos publicados por Maria Gioia e seus colaboradores⁶ e por Ruyi Xue e colaboradores⁴. No primeiro discute-se a importância da determinação dos açúcares na saliva. Em que a presença de uma elevada concentração de glucose nesta matriz pode estar associada a doenças específicas, como a diabetes. A principal vantagem na utilização desta matriz biológica é a sua recolha, que é feita de uma forma não evasiva. Sendo este fluido fisiológico constituído por proteínas, enzimas, hidratos de carbono e hormonas.

Cada vez mais o consumo excessivo de bebidas alcoólicas tem-se mostrado um grave problema para a saúde. Segundo Ruyi Xue⁴ pessoas que sejam consumidores constantes de álcool têm maior risco em contrair a doença diabetes. Indicando que mudanças nos níveis de glucose e aminoácidos no sangue pode ser utilizado como um indicador da exposição crónica ao álcool. Este autor realizou um trabalho com ratos expostos constantemente ao álcool, de forma a determinar as concentrações de açúcar

no sangue e no plasma com a técnica cromatográfica gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC-MS).

Relativamente à indústria farmacêutica, os açúcares são usados como excipientes dos medicamentos, de forma a proporcionar um sabor adocicado. Em fármacos, como os antibióticos aminoglicosídeos e os glicosídeos cardiotônicos (digitoxina)⁷ fazem parte da sua estrutura.

1.1.1. Monossacarídeos

Os monossacarídeos classificam-se, de acordo com o seu grupo funcional, aldeídos, cetonas e álcoois, e o seu número de átomos de carbono. Estes açúcares são distinguidos como cetoses, quando o seu grupo carbonilo é uma cetona e aldoses se o seu grupo carbonilo for um aldeído⁸.

Segundo as projecções de Fisher, os monossacarídeos designam-se D ou L consoante a configuração que apresentam no centro quiral do último carbono, estando o grupo carbonilo no cimo da cadeia aberta. Nomeadamente, D quando o grupo hidroxilo está à direita do centro quiral e L quando este se encontra à esquerda da cadeia^{1,9}.

Conforme, o tamanho do anel do açúcar, assim é definido o seu nome. As aldoses que contêm um anel hexagonal designam-se de piranoses e, as aldoses de anel pentagonal chamam-se de furanoses.

Os monossacarídeos que apresentam maior relevo nos sistemas biológicos são a glucose, galactose, frutose e ribose.

1.1.1.1. Glucose

A glucose é considerada o monossacarídeo mais importante do ponto de vista nutritivo e o mais abundante na natureza. Está presente no mel e nos frutos tais como figos, tâmaras e uvas. Este açúcar é transportado pelo sangue de forma a compensar as necessidades energéticas do organismo. Parte da glucose transforma-se em gorduras, e outra parte reage com compostos de nitrogénio, formando aminoácidos, os quais por sua vez, se combinam para formar proteínas que constituem grande parte do corpo do ser humano. Os restantes açúcares absorvidos pelo organismo são convertidos em glucose no fígado. No processo da fotossíntese, a glucose e a frutose apresentam-se de forma

destacada como produtos primários. Na fotossíntese as plantas transformam o dióxido de carbono em hidratos de carbono utilizando a luz solar como fonte de energia^{1,9,10}.

A glucose é constituída por seis átomos de carbono e um grupo carbonilo, aldeído, sendo conseqüentemente designada por aldo-hexose. A sua estrutura é ilustrada na figura 1.

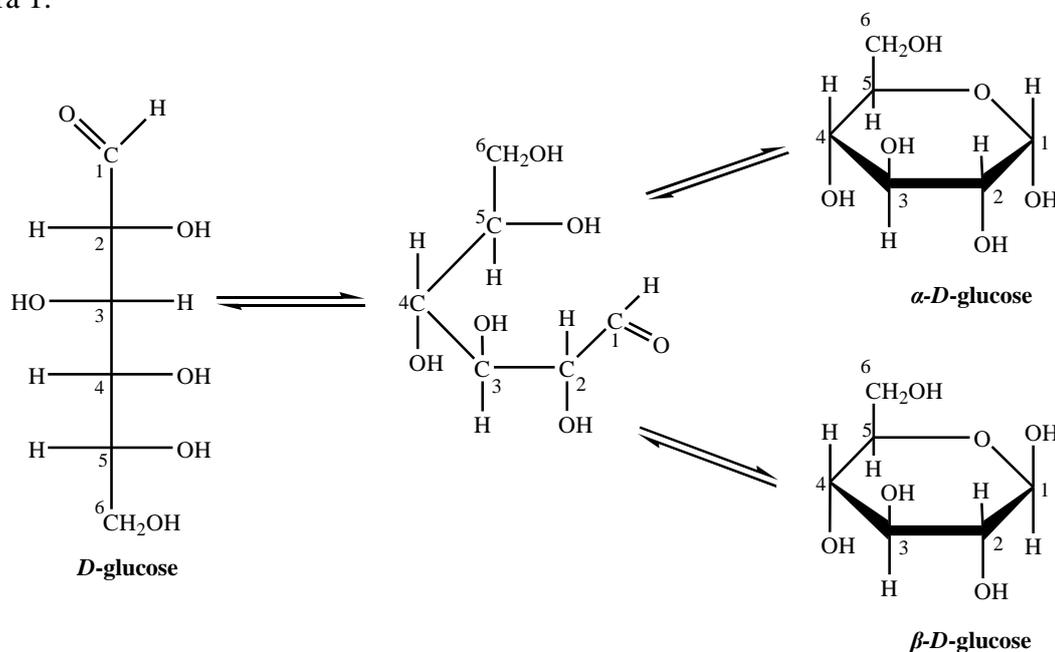


Figura 1 – Estrutura molecular da *D*-glucose na forma de cadeia aberta e os seus respectivos anómeros α e β .

A reacção entre o grupo aldeído do carbono C-1 e o grupo hidroxilo do carbono C-5 da estrutura de cadeia aberta forma um hemiacetal. A glucose tem estrutura cíclica, simplesmente porque o grupo aldeído e o grupo hidroxilo fazem parte da mesma molécula. A estrutura cíclica da *D*-glucose permite obter duas formas isómeras, dado que, a sua estrutura tem um centro quiral a mais que a estrutura da cadeia aberta. Esses isómeros são chamados de α e β -*D*-glucose. No isómero α o grupo hidroxilo no C-1 está abaixo do anel, e no isómero β no C-1 o grupo hidroxilo encontra-se acima do anel^{8,9}.

Como a glucose é um hemiacetal, os seus anómeros são facilmente hidrolisados em água. Em solução aquosa, qualquer dos anómeros se transforma através da cadeia aberta numa mistura em equilíbrio que contém ambos os isómeros cíclicos. O fenómeno de mutarrotação resulta de abrir e fechar o anel no hemiacetal. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear protónica (RMN ¹H) mostra que as formas α e β -piranose podem estar presentes na relação de 38:62^{9,11}.

O anómero β -*D*-glucopiranose, normalmente, é o único que pode assumir uma configuração em que todos os grupos volumosos (-CH₂OH e -OH) ocupam posições

equatoriais, apresentando uma conformação mais estável. Por esta razão é o anómero que aparece em maior quantidade na natureza. No caso do anómero α -*D*-glucopiranosose a conformação mais estável é aquela em que o grupo mais volumoso de todos (-CH₂OH) ocupa uma posição equatorial⁹.

1.1.1.2. Galactose

A galactose é um monossacarídeo simples que faz parte da estrutura química da lactose, estando presente em todos os produtos lácteos. Quando a galactose se encontra em concentrações elevadas na corrente sanguínea, pode provocar a doença galactosemia. Esta doença é caracterizada pela dificuldade que o organismo tem em metabolizar, no fígado, a galactose do leite e seus derivados em glicose. Este monossacarídeo pertence ao grupo das aldo-hexoses, constituído por seis átomos de carbono e um grupo aldeído (figura 2) e difere da estrutura da glucose na configuração do carbono C-4^{1,9}. Tal como a glucose encontra-se frequentemente na forma de piranose.

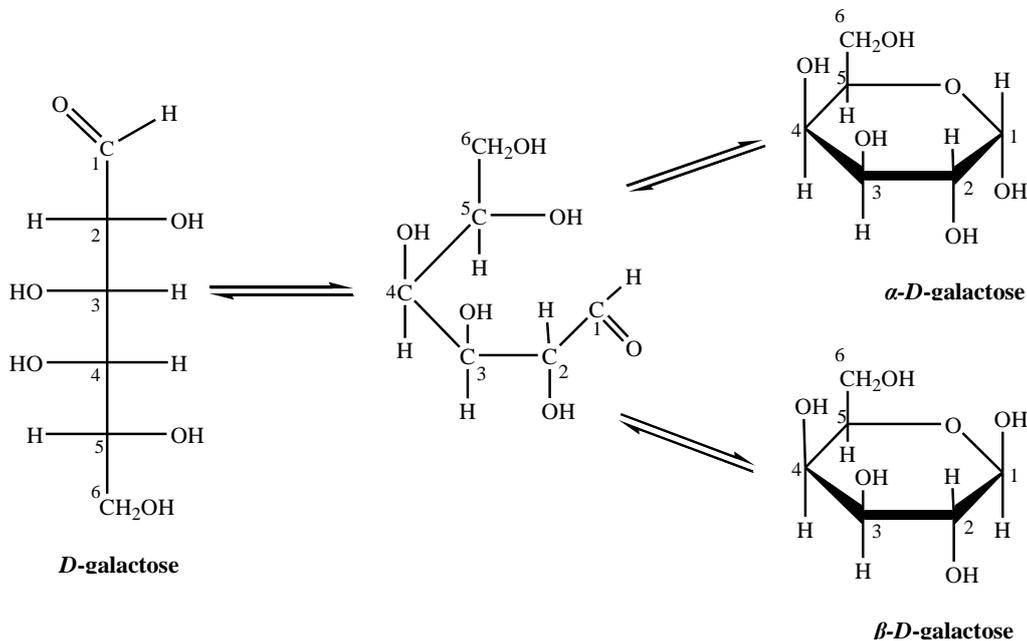


Figura 2 – Estrutura molecular da *D*-galactose na forma de cadeia aberta e os seus respectivos anómeros α e β .

1.1.1.3. Frutose

A frutose, igualmente denominada de levulose e açúcar dos frutos, é considerado o monossacarídeo mais doce. É o único que aparece em grandes quantidades no mel, xarope de milho e frutas doces. A frutose tem suscitado bastante interesse comercial porque é mais doce que a glucose, podendo ser obtida industrialmente a partir desta. A estrutura da frutose é similar à glucose como mostra a figura 3.

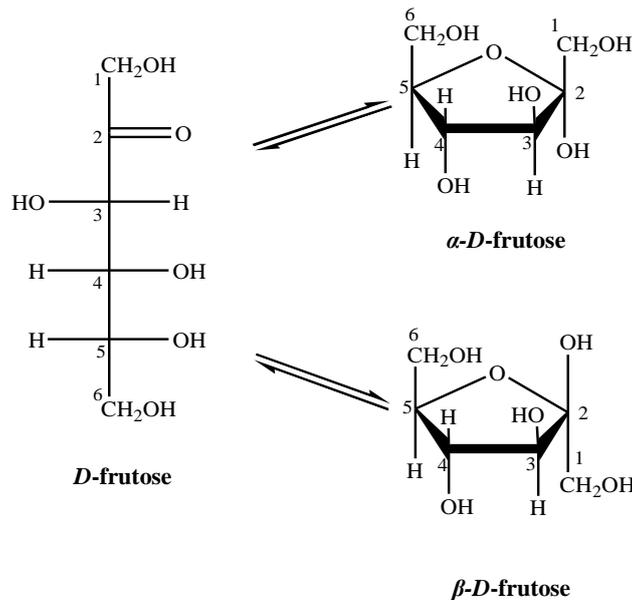


Figura 3 – Estrutura molecular da *D*-frutose na cadeia aberta e os seus respectivos anômeros α e β .

Esta cetose é constituída por seis átomos de carbono e uma cetona. A reacção que ocorre entre o grupo cetona no C-2 e o grupo hidroxilo no C-5 da cadeia aberta origina um hemicetal na molécula da frutose. Este monossacarídeo apresenta a conformação de furanose, podendo-se encontrar no anómero α -*D*-frutose e no β -*D*-frutose, que diferem entre si pela configuração que apresentam à volta do carbono C-2^{1,8,9}.

1.1.1.4. Ribose

A ribose é o elemento mais importante nas moléculas biológicas, incluindo DNA e RNA, e nas várias coenzimas, que têm um papel fundamental nas reacções bioquímicas do organismo.

A *D*-ribose pertence à família das aldo-pentoses, com cinco átomos de carbono e um grupo carbonilo aldeído. A estrutura de cadeia aberta é demonstrada na figura 4 e os seus respectivos isómeros cíclicos.

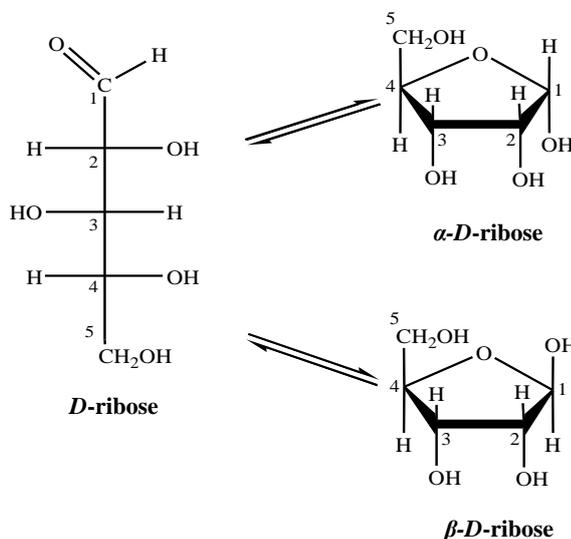


Figura 4 – Estrutura molecular da *D*-ribose na forma de cadeia aberta e os seus respectivos anómeros α e β .

1.1.2. Dissacarídeos

Os dissacarídeos são importantes fontes de hidratos de carbono que se encontram na maior parte dos alimentos, sendo de grande interesse para a indústria alimentar. Deste modo, estabelecer uma metodologia que permita a identificação e caracterização da sua estrutura de modo a determinar os seus componentes, também é objecto de estudo desta dissertação.

Os dissacarídeos são constituídos por duas unidades de monossacarídeos, unidos por uma ligação glicosídica. Esta ligação é formada pela reacção entre o grupo hidroxilo do C-1 do primeiro monossacarídeo e outro grupo hidroxilo do segundo monossacarídeo. Por hidrólise, a molécula do dissacarídeo produz duas moléculas de monossacarídeos. Os dissacarídeos mais comuns são a sacarose, lactose e maltose.

1.1.2.1. Sacarose

A sacarose é o açúcar de mesa, que se encontra em todos os vegetais que efectuem fotossíntese e é obtida industrialmente da cana-de-açúcar e da beterraba. De entre os

produtos químicos orgânicos, é o que se produz em maior quantidade e na forma mais pura.

Este dissacarídeo é constituído por uma unidade de α -D-glucose e uma unidade de β -D-frutose (figura 5).

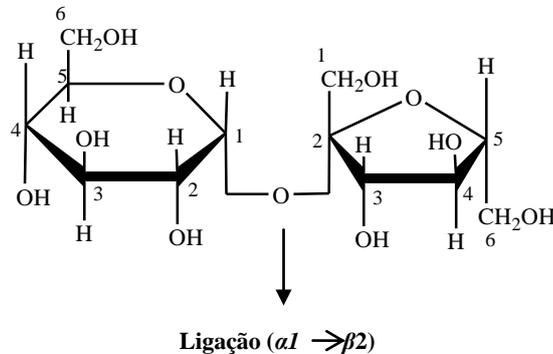


Figura 5 – Estrutura molecular da sacarose.

As duas unidades ligam-se uma à outra por uma ligação glicosídica entre o C-1 da glucose e o C-2 da frutose. Através desta união o grupo carbonilo encontra-se bloqueado, indicando que sacarose não apresenta formas anómeras quando dissolvida. Por esta razão distingue-se dos outros dissacarídeos^{8,9}.

1.1.2.2. Lactose

A lactose constitui cerca de 5% do leite materno e do leite de vaca. Obtém-se comercialmente, como subproduto da fabricação do queijo, a partir do soro do leite. Este dissacarídeo é composto por uma molécula de β -D-galactose e uma molécula α ou β -D-glucose. Na lactose o grupo hidroxilo do C-1 da β -D-galactose encontra-se ligado ao grupo hidroxilo do C-4 da β -D-glucose.

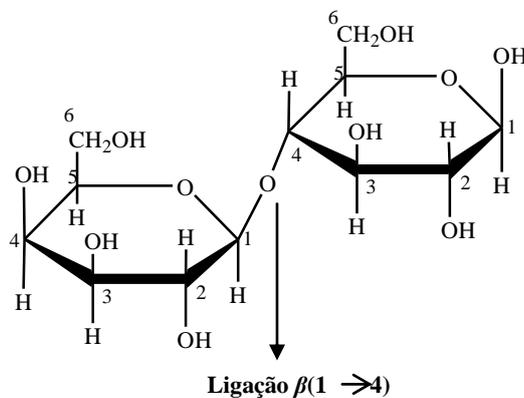


Figura 6 – Estrutura molecular da β -lactose.

A figura 6 ilustra a ligação glicosídica, designada de $\beta(1\rightarrow4)$, entre os dois monossacarídeos. Uma vez que o C-1 do fragmento da glucose mantém o grupo hemiacetal, a lactose existe sob a forma de anómero α e β ^{8,9}.

1.1.2.3. Maltose

A maltose pode obter-se, juntamente com outras substâncias, por hidrólise parcial do amido com soluções ácidas. Formando-se também num dos estádios da fermentação do amido para álcool etílico. Neste caso, a hidrólise é catalizada por uma enzima, diástase, que se encontra no malte (matéria prima da cerveja)^{8,9}.

A maltose é constituída por duas unidades de *D*-glucose, que estão unidas pela ligação glicosídica $\alpha(1\rightarrow4)$ (figura 7).

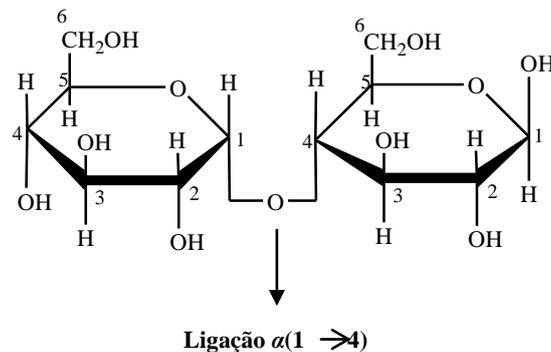


Figura 7 – Estrutura molecular da α -maltose.

1.2. Antibióticos aminoglicosídeos

Além da relevância que tem o desenvolvimento de métodos na determinação de açúcares, deve-se o facto de que estas moléculas fazem parte da constituição química de compostos de interesse farmacêutico, tal como os antibióticos aminoglicosídeos, aumentando o campo de aplicabilidade dos métodos desenvolvidos.

Em 1943, Waksman e seus colaboradores isolaram a estreptomicina a partir de um actinomicete (*Streptomyces griseus*), iniciando-se assim a era dos antibióticos aminoglicosídeos. Posteriormente, foram descobertos novos antibióticos (tabela 1) com características bastante homogêneas e com grande utilidade terapêutica.

Tabela 1 - Principais aminoglicosídeos, período em que foram descobertos e tipo de origem.

Aminoglicosídeos	Data	Origem
Estreptomicina	1944	Natural
Neomicina	1949	Natural
Canamicina	1957	Natural
Gentamicina	1963	Natural
Trobramicina	1967	Natural
Amicacina	1972	Semi-sintético
Netilmicina	1975	Semi-sintético

Estes antibióticos devem ser utilizados preferencialmente no tratamento de doenças graves, tais como: infecções do trato respiratório, preferencialmente associados a antibióticos β -lactâmicos; infecções intrabdominais e infecções pélvicas; infecções urinárias graves; quadros de septicemias; endocardites por enterococos; infecções da pele, tecidos moles e ósseos; meningites (administração intra-tecal), meningites pós-traumáticas ou pós-cirúrgicas¹².

Por último, os aminoglicosídeos também podem ser utilizados topicamente no tratamento de doentes queimados, conseguindo-se boas absorções e excelentes níveis séricos.

Os aminoglicosídeos exibem potencialidades nefrotóxicas, ototóxicas e neurotóxicas, o que limita o uso clínico generalizado. A nefrotoxicidade resulta da acumulação progressiva de aminoglicosídeos na urina aumentando os seus efeitos tóxicos, consoante a dose de antibiótico administrada. A sua toxicidade é geralmente reversível se a terapêutica for suspensa precocemente¹².

Os aminoglicosídeos tendem a acumular-se nos fluidos do ouvido interno revelando efeitos ototóxicos. Normalmente, a ototoxicidade é irreversível e pode-se manifestar como lesão vestibular e/ou coclear¹².

Quando administrados em doses elevadas, por via intra-muscular ou intravenosa, os aminoglicosídeos podem causar bloqueios neuromusculares levando a paragens respiratórias. São também exemplo de outras manifestações de neurotoxicidade mais raras, a nevrite óptica, parestesias, cefaleias e irritabilidade¹².

1.2.1. Origem

A maior parte dos aminoglicosídeos é de origem natural, produzida por microrganismos pertencentes à família das Actinobacteria, designadamente membros dos géneros *Streptomyces* (estreptomicina, neomicina, canamicina e amicacina) e *Micronospora* (gentamicina, sisomicina, netilmicina). Sendo alguns destes antibióticos obtidos por derivatização química à custa dos produtos naturais, com a introdução de novos radicais. A amicacina e a netilmicina são derivados semi-sintéticos, respectivamente, da canamicina e da sisomicina. Actualmente, a produção dos aminoglicosídeos pode ser feita por síntese química, mas o processo de obtenção por via da fermentação continua a ser mais económico para a sua produção^{12,13}.

1.2.2. Estrutura química e suas características

Os aminoglicosídeos são constituídos por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligações glicosídicas a uma hexose aminada (núcleo aminociclitol). Esta hexose é a 2-deoxiestreptamina, em todos os aminoglicosídeos com interesse clínico, com excepção da estreptomicina na qual é substituída pela estreptidina (figura 8)¹³.

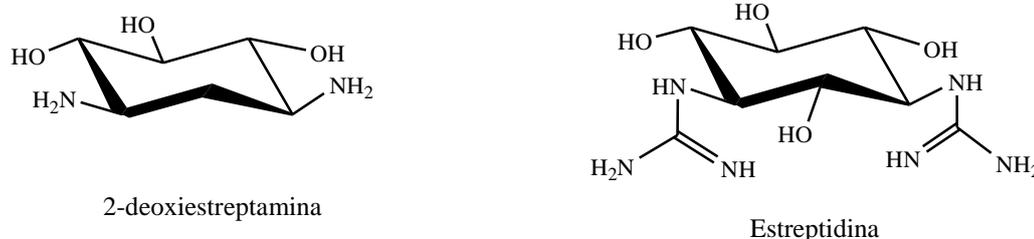


Figura 8 – Estrutura da 2-deoxiestreptamina e estreptidina.

As subclasses mais importantes dos aminoglicosídeos são as 4,5-dissubstituídas deoxiestreptaminas, que incluem a neomicina e a paromicina, e as 4,6-dissubstituídas deoxiestreptaminas, que correspondem à amicacina, gentamicina, canamicina e tobramicina^{14,15}.

Devido ao grande número de radicais amino e hidroxilo que possuem, os aminoglicosídeos são polcatiões com características básicas e com uma elevada polaridade. Estes antibióticos têm uma elevada solubilidade em água, são relativamente insolúveis em lipídios, e a sua actividade antimicrobiana é mais significativa em meio

alcalino. As suas características polares fazem com que a sua absorção por via oral ou rectal seja baixa, inferior a 1% da dose administrada, por isso após a sua administração, vão aparecer quase na sua totalidade nas fezes, na forma intacta, o que incapacita a obtenção de níveis sistémicos e eficazes. Por outro lado a via intramuscular e a via intravenosa permite obter rapidamente níveis sanguíneos terapêuticos^{13,15}.

1.2.3. Neomicina

Em 1949, Umezawa e Waksman a partir de culturas de *Streptomyces fradiae* e *Streptomyces albogriseolus*, isolaram um novo antibiótico de largo espectro terapêutico, a neomicina. Este aminoglicosídeo exibe uma excelente actividade antibacteriana contra as bactérias gram-negativas e parcialmente contra as bactérias gram-positivas.

Como antibiótico, a neomicina consiste numa mistura de três aminoglicosídeos: neomicina B (também conhecida como framicitina) é o componente principal que apresenta maior actividade antibiótica (figura 9), e dois componentes secundários, neomicina A e neomicina C. A neomicina A possui apenas 10% da actividade antibiótica dos componentes principais¹⁶.

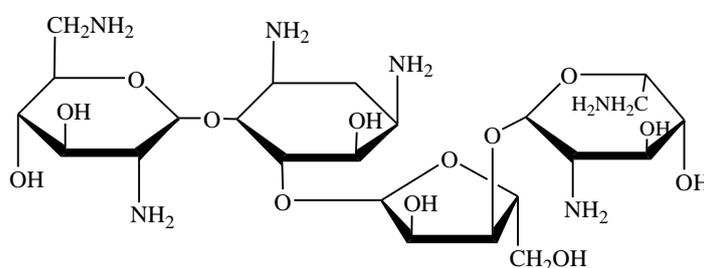


Figura 9 – Estrutura química da neomicina B.

A neomicina existe na forma de sais de sulfato, apresentando-se como um pó branco. É facilmente solúvel em água, moderadamente solúvel em metanol e etanol, e praticamente insolúvel em solventes orgânicos hidrofóbicos.

Quanto à sua actividade, é um antibiótico de largo espectro, que actua contra *S. aureus* e bacilos gram-negativos, mas sem grande actividade contra *P.aeruginosa*. Tal como os outros aminoglicosídeos, não é absorvido praticamente no tracto gastrointestinal sendo eliminado nas fezes de forma inalterada. Caracteriza-se pela sua elevada ototoxicidade e nefrotoxicidade, razões pelas quais é apenas utilizada na terapêutica por via oral e em aplicações tópicas¹².

Enquanto fármaco, a neomicina é purificada e acoplada com iões de sulfato, sendo utilizada em uma grande variedade de antibióticos de produtos farmacêuticos, rotulados como contendo sulfato de neomicina¹⁷.

Presentemente, em Portugal, a neomicina encontra-se comercializada em diferentes formulações farmacêuticas, tais como, as soluções injectáveis, os colírios, as pomadas oftalmológicas e os cremes. Este antibiótico pode ser utilizado sozinho ou em associação com outras substâncias activas, como por exemplo, bacitracina, dexametasona e polimicina¹⁶.

1.2.4. Netilmicina

A netilmicina é um antibiótico aminoglicosídeo semi-sintético, obtido a partir da sisomicina pela introdução de um grupo etil na posição 1-*N*. Apesar de a netilmicina ser o principal produto de alquilação e acilação selectiva das funções de nitrogénio da sisomicina, pequenas quantidades de alguns derivados de *N*-etil de sisomicina podem estar presentes neste antibiótico. A garamina também pode ser formada por hidrólise da sisomicina, 1-*N*-etil-garamina pode ser observada em amostras de sulfato de netilmicina^{18,19}. A estrutura da netilmicina e suas substâncias semelhantes são mostradas na figura 10.

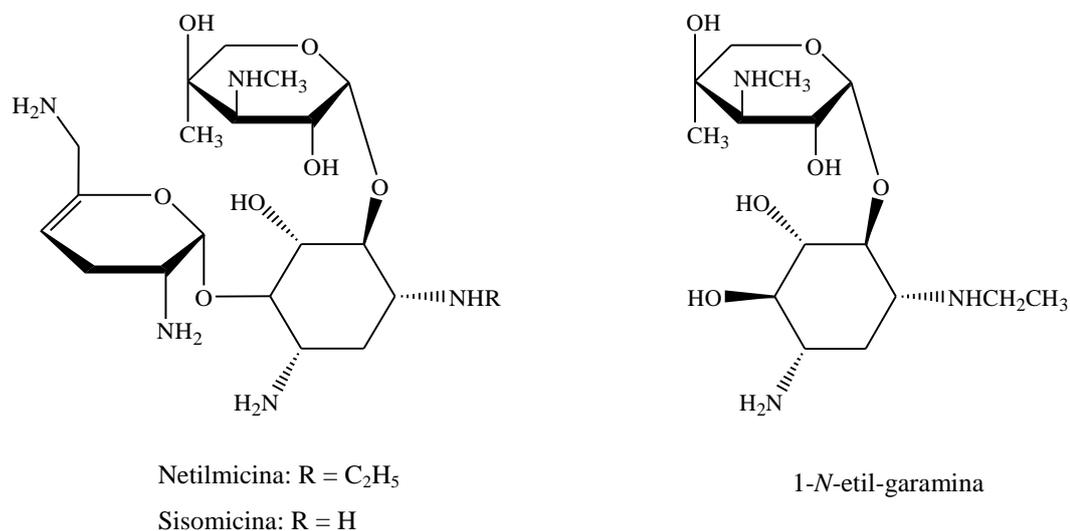


Figura 10 – Estrutura química da netilmicina, sisomicina e 1-*N*-etil-garamina.

A netilmicina aparece sob a forma de um pó amarelo, é altamente polar e tem características de solubilidade semelhantes à neomicina. Devido às suas propriedades,

não é completamente absorvida pelo tracto intestinal, sendo administrada por via intravenosa ou via intramuscular.

Este fármaco exibe um amplo espectro de actividade contra bactérias gram-negativas e algumas bactérias gram-positivas, causando menos nefrotoxicidade e ototoxicidade que a gentamicina e a sisomicina. No entanto, para garantir a eficácia do tratamento terapêutico com o mínimo de efeitos colaterais, o seu acompanhamento deve ser regular¹⁹.

Actualmente, a netilmicina é comercializada em soluções injectáveis e colírios.

1.3. Métodos analíticos

1.3.1. Revisão da literatura

1.3.1.1. Hidratos de carbono

No que concerne à determinação de hidratos de carbono em matrizes biológicas, alimentos e bebidas, têm sido propostos vários procedimentos baseados nas técnicas cromatográficas. Neste âmbito destaca-se a cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), e em menor uso, a electroforese capilar. Vários detectores associados a estes métodos cromatográficos têm sido utilizados para quantificar os açúcares, nomeadamente: a cromatografia gasosa encontra-se associada à detecção de ionização de chama e à espectrometria de massa (MS). Enquanto a cromatografia líquida de alta pressão, encontra-se ligada à detecção de índice de refração, à detecção amperométrica pulsada, e à detecção por detector evaporativo por dispersão de luz^{2,20}.

Na literatura consultada, o método mais comumente utilizado é a cromatografia gasosa. No entanto devido à elevada polaridade, hidrofiliabilidade e baixa volatilidade, os açúcares têm de ser convertidos em derivados mais estáveis, através de reacções de silição e acetilação, antes de serem analisados.

Em 1957 Clarence Chang²¹, estabeleceu uma metodologia para a identificação da sacarose por cromatografia gasosa, utilizando uma solução de piridina com trimetilclorosilano (TMCS), a uma temperatura de 85°C durante duas horas.

Na década de 70, Paul Larson²², modificou a metodologia proposta por C. Sweeley, adicionando piridina, hexametildisilazano e trimetilclorosilano a uma solução

aquosa de lactose e sacarose, utilizando um banho de ultra-sons durante dois minutos para dissolução da amostra, sendo analisadas as amostras por cromatografia gasosa.

Diversos estudos desde então, têm sido realizados a fim de identificar e quantificar os hidratos de carbono nas mais variadas matrizes. Em 2004 Maria Gioia⁶, desenvolveu uma metodologia para a determinação da concentração de glucose presente na saliva humana. A glucose primeiramente foi extraída da matriz, seguindo-se a sua derivatização com anidrido acético e cloreto de zinco durante uma hora a uma temperatura de 50°C, subseqüentemente analisaram a glucose penta-acetilada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Patrícia Medeiros² em 2006 analisou partículas de aerosol, amostras de solos e sedimentos, identificando vários açúcares ambientais (por exemplo, glucose, frutose, sorbitol, sacarose). O procedimento consiste na extracção desses açúcares e posteriormente a sua derivatização usando *N-O-Bis*-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) e piridina a uma temperatura de 70°C durante três horas, utilizando como técnica cromatográfica o GC-MS.

Em 2007 Ruyi Xue⁴ determinou simultaneamente glucose e isoleucina em sangue de ratos após a sua exposição crónica ao álcool, por GC-MS. Usando a derivatização assistida por microondas permitiu a redução do tempo reaccional. A reacção de sililação consiste na adição de *N*-metil-*N*-trifluoroacetamida (MSTFA) a uma solução aquosa de glucose previamente evaporada.

1.3.1.2. Antibióticos aminoglicosídeos

A determinação da neomicina, e da netilmicina tem sido efectuada nas mais variadas matrizes, principalmente biológicas e formulações farmacêuticas. No caso particular dos produtos farmacêuticos, estes antibióticos aparecem sob a forma de sal, nomeadamente sulfato de neomicina e sulfato de netilmicina.

Na literatura estão descritas diferentes metodologias para a análise do sulfato de neomicina e de netilmicina nas formulações farmacêuticas, permitindo a realização de estudos de estabilidade, controlo de qualidade e testar a autenticidade de um determinado produto farmacêutico¹⁰.

Para a determinação dos antibióticos aminoglicosídeos estão associados diversos métodos, nomeadamente, microbiológicos, imunoensaios enzimáticos, radioimunoensaios e cromatográficos. Os ensaios microbiológicos são simples e de

baixo custo, mas não específicos e demorados, pois requerem cerca de 4 a 24 horas de incubação. Nos imunoenaios enzimáticos, existe uma grande instabilidade das enzimas e não apresentam versatilidade em aplicações de análise química. Os radiomunoensaios são rápidos, sensíveis e precisos, mas é obrigatório a utilização de material radioactivo e é exigido um anticorpo específico para cada aminoglicosídeo em estudo. Por último, os métodos cromatográficos são imprescindíveis para a determinação quantitativa e qualitativa dos aminoglicosídeos. Oferecendo diversas vantagens, tais como: rápida performance; elevada precisão; reagentes facilmente disponíveis e equipamento versátil utilizado na maioria dos laboratórios^{10,23,24}.

No entanto, os antibióticos aminoglicosídeos são difíceis de determinar, devido à sua semelhança estrutural, elevada polaridade, baixa volatilidade, à falta de cromóforos e serem compostos hidrofílicos.

A indústria farmacêutica realiza a análise deste tipo de antibióticos através de HPLC, mas por não apresentarem grupos cromóforos não são detectáveis por UV-Visível, detectores mais comuns em cromatografia líquida, devido à sua elevada polaridade não são analisáveis por cromatografia gasosa. Também a identificação das principais impurezas destes antibióticos é completamente impossível com a detecção por UV, devido à falta de ligações duplas na sua estrutura química^{14,25}.

Vários métodos para determinação de aminoglicosídeos e suas impurezas têm sido descritos: usando métodos de detecção electroquímica pulsada, HPLC-UV com derivatização dos aminoglicosídeos, electroforese capilar com prévia derivatização e HPLC utilizando detecção amperométrica. No entanto, estes métodos requerem equipamentos de elevado custo e são pouco utilizados nos laboratórios de análise química ou laboratórios farmacêuticos^{23,26}.

Tem-se desenvolvido metodologias de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS-MS) para a análise de gentamicina, neomicina e outros antibióticos da mesma família^{19,25}. Mais recentemente Adams¹⁹ e seus colaboradores descrevem a caracterização da sisomicina, netilmicina e as suas principais impurezas. No entanto, não há qualquer metodologia por GC-MS para a identificação destes compostos.

1.3.2. Cromatografia gasosa

Na cromatografia gasosa, a amostra é injectada no topo de uma coluna cromatográfica. A eluição é feita por fluxo de um gás de arraste inerte que actua como fase móvel. Ao contrário da maioria dos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito, a sua função é transportar o analito através da coluna. O gás de arraste geralmente mais utilizado é o hélio, o azoto, e o hidrogénio. Este deve ser quimicamente inerte e a sua escolha depende da disponibilidade, pureza, consumo e tipo de detector utilizado^{27,28,29}.

A figura 11 ilustra os componentes básicos de um equipamento para cromatografia gasosa.

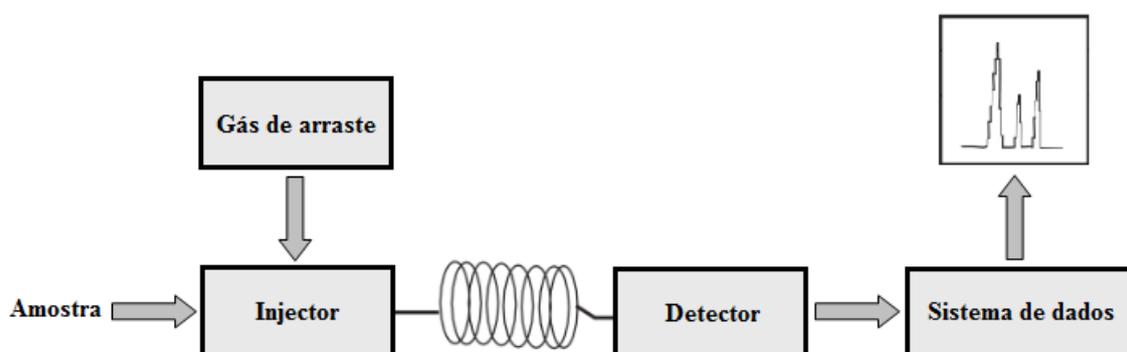


Figura 11 – Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás.

As amostras podem ser gasosas, líquidas ou sólidas, sendo o método de injeção diferente para cada caso. O método mais comum de injeção envolve o uso de microseringas, injectando a amostra através de um orifício de borracha ou silicone localizado no topo da coluna. A temperatura do injector deve ser suficiente para que a amostra líquida vaporize rapidamente sem decomposição ou fraccionamento. Sendo normalmente mantida cerca de 50°C acima do ponto de ebulição dos componentes da amostra^{28,29}.

A separação dos componentes da amostra é feita na coluna. Em cromatografia gasosa, as colunas podem dividir-se em, colunas capilares e empacotadas. Estas variam em comprimento de 2 a 50 metros, sendo construídas por aço inoxidável, vidro, sílica fundida ou teflon. As colunas capilares são mais eficientes que as empacotadas, obtendo-se melhores separações a baixa temperatura e a intervalos de tempo menores. A temperatura da coluna é uma variável importante que deve ser controlada. A temperatura óptima da coluna depende do ponto de ebulição da amostra e do grau de

separação que se deseja. De grosso modo, uma temperatura igual ou ligeiramente acima do ponto de ebulição duma amostra, resulta um tempo de eluição de 10 a 30 minutos. Quando se pretende separar amostras com volatilidades diferentes, é necessário criar uma rampa de temperatura. Porque os componentes com um ponto de ebulição baixo são eluídos rapidamente, enquanto as espécies menos voláteis levam mais tempo a eluir²⁸.

A função do detector, situado à saída da coluna, é registar e medir pequenas quantidades dos componentes da mistura separados na coluna e levados pelo fluxo do gás de arraste. A resposta do detector a cada componente é registada na forma de um cromatograma (abundância relativa vs. Tempo). Os dados são depois processados com recurso a ferramentas informáticas específicas para o efeito.

A escolha do detector depende de vários factores, nomeadamente: sensibilidade adequada; boa estabilidade e reprodutibilidade; resposta linear para os analitos, que permita utilizar várias ordens de grandeza; intervalo de temperaturas, que abranja desde a temperatura ambiente até, pelo menos, 400°C; similaridade na resposta para todos os analitos ou uma resposta alternativa previsível e selectiva para uma ou mais classes desses analitos; e por fim não destruir a amostra^{27,28,29}.

1.3.2.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

A técnica GC-MS revolucionou a análise dos compostos voláteis e permitiu obter informação importante sobre misturas de compostos sintéticos ou naturais. Em termos instrumentais esta técnica consiste na junção de um cromatógrafo gasoso e de um espectrómetro de massa, em que este funciona como um sistema de detecção altamente específico e universal. A figura 12 indica um instrumento típico de um GC-MS.

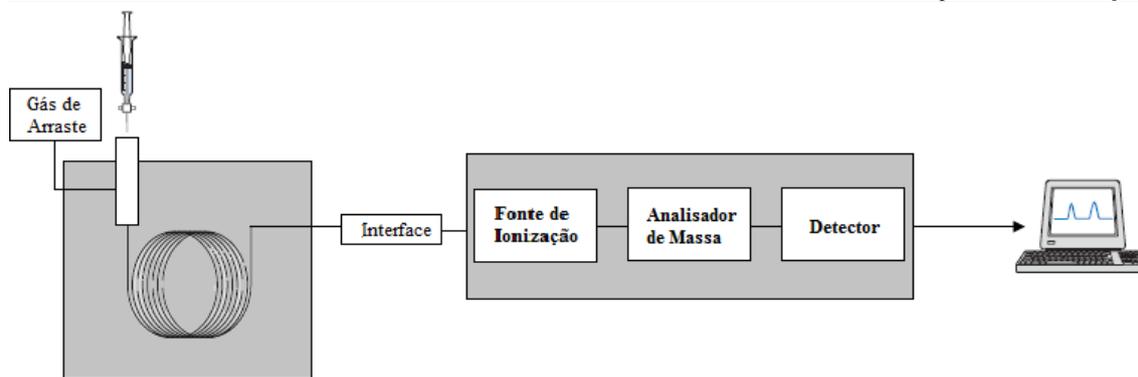


Figura 12 – Esquema de um sistema típico de GC-MS.

No GC-MS a amostra é injectada no capilar do GC. Os seus componentes são separados na coluna e entram no espectrómetro de massa através da interface. Estes são ionizados e fragmentados na fonte de ionização e posteriormente analisados e detectados.

A cromatografia gasosa é uma técnica que utiliza quantidades diminutas de analito. Nessa perspectiva, a espectrometria de massa que permite identificar quantidades de amostra muito reduzidas, tornou-se um detector ideal para a técnica cromatográfica. No entanto, existe uma incompatibilidade de acoplamento no que diz respeito às diferenças de pressão entre as duas técnicas. Enquanto a cromatografia gasosa opera à pressão atmosférica, a espectrometria de massa funciona em condições de alto vácuo. Sendo necessário o desenvolvimento de uma interface adequada que permitisse a associação destas técnicas.

Os componentes do espectrómetro de massa têm de estar sob sistema de vácuo, permitindo a conversão da maior parte das moléculas em iões, com um tempo de retenção suficientemente longo para ser analisado. A pressão do sistema deve ser baixa (10^{-4} torr a 10^{-8} torr) sendo capaz de produzir vácuo, mesmo quando se analisam moléculas orgânicas voláteis e aquecidas até 300°C^{27} .

O analito é vaporizado e transportado para a fonte de ionização. Naturalmente, os analitos introduzidos no espectrómetro de massa são tipicamente neutros necessitando portanto de ser ionizados.

Os métodos de ionização são fundamentais na espectrometria de massa, produzindo fragmentos e quebrando as ligações químicas das moléculas da amostra, os quais também podem ser ionizados. Existem diversas fontes de ionização, tais como, ionização química (CI), ionização por bombardeamento com átomos rápidos (FAB), ionização por impacto electrónico (EI), entre outros.

A fonte de ionização mais comum em espectrometria de massa é por impacto electrónico, ocorrendo um bombardeamento na amostra de electrões com elevada energia. É gerado um feixe de electrões num filamento aquecido que emite electrões térmicos que são acelerados através de uma diferença de potencial incidente na amostra, que se encontra na fase gasosa de alta energia, produzindo iões positivos e negativos por perda ou ganho de electrões, ou espécies neutras.

Os catiões produzidos no processo de impacto electrónico têm uma energia de excitação. Essa energia interna é energia rotacional, vibracional e electrónica, e é dissipada por reacções de fragmentação produzindo fragmentos de menor massa que o ião molecular, as quais podem ainda sofrer fragmentações secundárias. Muitas vezes o ião molecular aparece com uma abundância muito pequena e pode acontecer mesmo o caso de este não ser visível no espectro de massa^{29,30}.

Os catiões são conduzidos para o analisador de massa por repulsão electrostática. O analisador de massa tem a função de seleccionar os iões de acordo com os seus valores massa/carga (m/z). Os analisadores mais comumente utilizados são o quadrupolo e o ion trap (armadilha de iões).

A principal vantagem da utilização do analisador quadrupolo é ser um instrumento robusto, económico e de pequena dimensão. É formado por quatro cilindros de metal paralelos, no qual é aplicada uma voltagem. Os iões produzidos na fonte de ionização passam entre os quatro cilindros e atingem o detector com diferentes tempos de retenção, consoante os valores m/z dos iões.

No detector o feixe de iões é convertido num sinal eléctrico. Uma vez que a separação depende das diferentes trajectórias seguidas pelo feixe de iões através da combinação de campos eléctricos e magnéticos.

A análise de dados é controlada por um computador, que segue as instruções pré-definidas do operador. O controlo da função de varrimento é de extrema importância visto que desta resulta os dados necessários para a caracterização dos produtos analíticos. No caso de se usar o modo de varrimento contínuo (full scan), o computador inicia varrimentos repetitivos de valores m/z em função do tempo, gerando um cromatograma de corrente iónica total (TIC). Consiste em somar as correntes geradas pela totalidade dos iões fragmentos à medida que a molécula do pico da cromatografia gasosa passa através do detector. Enquanto na monitorização de iões seleccionados (SIM), as massas a monitorizar são seleccionadas antes do varrimento. O traçado cromatográfico é feito somente com base no sinal gerado por alguns iões de massas

seleccionadas por serem características de um determinado analito. Apresenta uma melhor razão sinal/ruído mas perde-se informação espectral²⁸.

1.3.3. Reacções de derivatização

Para determinação de compostos polares por GC-MS é necessário a utilização da etapa de derivatização, que permite a modificação da funcionalidade da molécula, aumenta a sua volatilidade, diminui a polaridade e melhora a sua estabilidade. A derivatização permite também a redução da adsorção do analito no GC, melhorando a resposta no seu detector e uma separação mais eficiente dos picos cromatográficos.

A escolha do reagente derivatizante baseia-se no grupo funcional (aminas, ácidos carboxílicos, cetonas, aldeídos e álcoois) que é necessário derivatizar, na estrutura química e propriedades da molécula. Conforme aumenta o número de grupos derivatizados na molécula, há o risco, de que a massa molecular da substância derivatizada se encontre fora da gama do espectrómetro de massa³¹.

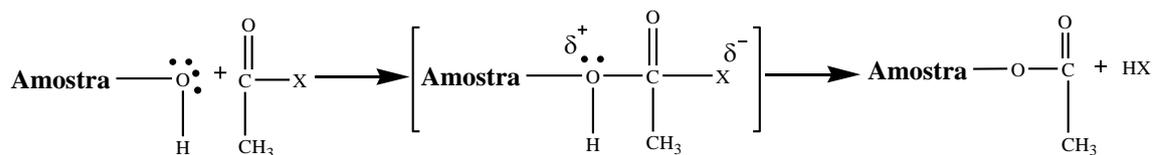
Alguns critérios devem ser utilizados como directrizes na selecção do reagente derivatizante, nomeadamente: a reacção de derivatização deve ser completa, de 95-100%; não causar qualquer rearranjo ou alteração estrutural na amostra durante a formação do derivado; e por fim, obter um derivado que seja estável em relação ao tempo da reacção³².

Os métodos mais comumente utilizados de derivatização são a alquilação, acetilação e silição, ocorrendo uma substituição do hidrogénio dos grupos polares, como, NH, OH, e SH por grupos alquilo, acilo e sililo. Essas substituições aumentam significativamente a volatilização das amostras.

1.3.3.1. Reacção de acetilação

A reacção de acetilação consiste na introdução de um grupo acilo (COCH_3) em uma molécula que contenha hidrogénios, tais como, grupos hidroxilo, amino e tióis.

No caso específico dos álcoois, estes reagem na presença de um grupo acilo formando ésteres. Nestas reacções, o grupo hidroxilo actua como nucleófilo, atacando o grupo carbonilo do derivatizante (esquema 1).



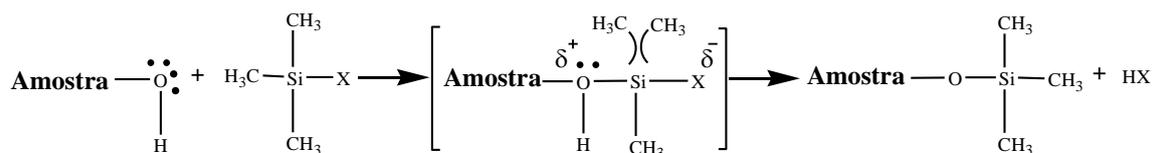
Esquema 1 – Mecanismo geral da reacção de acetilação.

A reacção de derivatização ostenta diversos benefícios, nomeadamente: melhora a estabilidade do analito, protegendo os grupos que se encontram mais instáveis; a amostra derivatizada confere maior volatilidade, facilitando a sua separação cromatográfica; e reduz a polaridade da amostra³².

O anidrido acético e o anidrido trifluoroacético são considerados os derivatizantes mais triviais nestas reacções. O excesso de derivatizante é removido após a conclusão da reacção, de forma a evitar uma derivatização secundária quando amostra for injectada no capilar do GC-MS, e também, efeitos destrutivos que possa causar na coluna. A remoção deste, normalmente consiste numa etapa de evaporação seguida de solvatação. Por conseguinte, a acetilação com anidridos é vulgarmente realizada com o solvente piridina. É uma base relativamente fraca que facilita o ataque nucleofílico entre a amostra e o derivatizante, actuando como neutralizador do ácido acético que se forma como produto secundário nas reacções de acetilação^{33,34}.

1.3.3.2. Reacção de sililação

A sililação é a reacção de derivatização mais amplamente utilizada, tendo como objectivo, a substituição do hidrogénio (grupo hidroxilo ou grupo amino) pelo grupo trimetilsilil (TMS). Reduzindo a polaridade do composto e da formação de ligações de hidrogénio. A sililação, e em geral as reacções de derivatização, têm como vantagem o aumento de volatilidade e estabilidade dos compostos. O esquema 2 ilustra o mecanismo geral da reacção de sililação.



Esquema 2 – Mecanismo geral da reacção de sililação.

A reacção de sililação ocorre através do ataque nucleófilo ao átomo sililo, obtendo-se um estado de transição bimolecular (S_N2). O composto trimetilsilil abandona o grupo X e liga-se ao átomo de oxigénio da amostra que se pretende derivatizar, ocorrendo a formação de grupos funcionais éteres. O grupo X deve possuir uma baixa basicidade, capacidade de estabilizar a sua carga negativa no estado de transição e não deve ter tendência para se ligar novamente ao grupo sililo³⁴.

A eficiência da reacção depende do agente de sililação, quanto mais forte for aceitação de cargas do composto sililado, maior é o rendimento da reacção.

O derivatizante mais versátil e comum, é o *N-O*-Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano (BSTFA-TMCS), o qual produz derivados do éter trimetilsilil, uma vez que este reagente permite a derivatização de uma vasta gama de compostos orgânicos polares, como os açúcares e os aminoglicosídeos^{32,34}. Os produtos da reacção são mais voláteis e termicamente mais estáveis, além de que não requerem a etapa de purificação, podendo serem injectados directamente no GC-MS³³. O solvente mais habitual nas reacções de sililação é a piridina, uma vez que inibe a formação de produtos secundários.

1.3.4. Derivatização acelerada por microondas

O processo de derivatização acelerada por microondas (Microwave-accelerated Derivatization – MAD) tem ganho popularidade significativa em diversas áreas: toxicologia forense, controlo anti-doping, indústria farmacêutica, nanotecnologia, e na síntese da química orgânica.

Aplicação da técnica MAD é de extrema importância para uma eficaz derivatização de compostos, como os hidratos de carbono e os aminoglicosídeos, posteriormente identificados e quantificados por GC-MS.

O aquecimento convencional difere do aquecimento por microondas por este não apresentar efeito dieléctrico, uma vez que o seu aquecimento surge por condução, irradiação e convecção. No aquecimento convencional, o aquecimento decorre primeiramente no recipiente e posteriormente na amostra, aumentando significativamente o tempo da reacção. Enquanto, no microondas o aquecimento ocorre directamente na amostra, tornando conseqüentemente o aquecimento mais rápido³⁵.

No aquecimento dieléctrico existem dois mecanismos principais para a transformação de energia electromagnética em calor. O primeiro mecanismo, rotação dipolar, no qual relaciona o alinhamento das moléculas que tem dipolos permanentes ou induzidos, com o campo eléctrico aplicado. Quando o campo eléctrico é removido, as moléculas voltam ao seu estado desordenado e a energia que foi absorvida para sua orientação é dissipada na forma de calor. O segundo mecanismo é designado de condução iónica, via partículas portadoras de carga eléctrica, habitualmente iões atómicos ou moleculares. Estas perdas dependem do tamanho, carga, condutividade dos iões dissolvidos e interacção dos iões com o solvente^{35,36}.

Quando sujeito a uma frequência de microondas, as características de aquecimento de uma determinada substância, como por exemplo, um solvente orgânico, dependem fortemente das suas propriedades dieléctricas. A capacidade de absorver e converter energia electromagnética em energia térmica, a uma dada temperatura e frequência, é determinada pelo factor de perda, $\tan \delta$. Este parâmetro expressa a razão entre a perda dieléctrica, ϵ'' , indicativa da eficácia com que a energia electromagnética é convertida em calor, e a constante dieléctrica, ϵ' , representativa da capacidade de um material ser polarizado sob a influencia de um campo eléctrico externo, absorvendo e acumulando energia potencial eléctrica, ou seja, $\tan \delta = \epsilon''/\epsilon'$. Assim, quanto maior for o seu valor, maior é o aquecimento da substância por microondas. A polaridade do solvente influencia a capacidade de interligação das moléculas com a energia do microondas. Em geral, substâncias polares absorvem melhor por microondas, enquanto substâncias menos polares ou substâncias com dipolo nulo têm uma absorção mais fraca^{35,36,37}.

Uma revisão da literatura revela que a utilização do MAD apresenta vantagens nas reacções orgânicas, em sistemas homogéneos e heterogéneos. Permitindo a possibilidade de alcançar maior taxa de rendimento da reacção, maior selectividade e menor decomposição térmica. O recipiente utilizado na reacção deve ser transparente (como por exemplo, teflon) e, conseqüentemente, a energia é absorvida somente pelos reagentes ou solventes. O aquecimento por MAD reduz significativamente o tempo necessário para a derivatização de um composto, podendo ser reduzido de uma hora para minutos. Conseguindo-se melhores resultados finais, uma vez que, também, permite a redução de produtos secundários não pretendidos, tendo ainda a capacidade de aquecer a amostra de uma forma uniforme^{33,38}.

O sistema de microondas encontra-se equipado com controlo e monitorização simultânea da temperatura, pressão e potência. A temperatura da reacção do microondas é monitorizada através de um sensor de infravermelhos contido no interior do vaso reaccional (figura 13).



Figura 13 – Derivatização acelerada por microondas.

1.3.5. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa sequencial

A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) tornou-se uma ferramenta indispensável em diversas áreas de aplicação, uma vez que fornece alta sensibilidade, segurança e produtividade necessária para as áreas de toxicologia, farmacêutica, alimentar, química, ambiental, entre outras. Esta técnica apresenta vantagens na identificação e quantificação de compostos polares com elevado peso molecular.

O LC-MS combina a capacidade de separação física da cromatografia líquida (LC) com a capacidade de análise da espectrometria de massa. A cromatografia líquida separa e identifica os analitos de uma amostra. A sua separação ocorre por meio de um mecanismo de interacção selectiva entre as moléculas presentes na amostra e as duas fases, fase móvel e fase estacionária. No caso da cromatografia líquida de partição (líquido-líquido) de fase reserva (fase estacionária não polar e fase móvel polar) onde primeiro são eluídos os solutos polares e só depois os solutos não polares. A escolha da fase móvel também é vital em LC. O seu poder de eluição é determinado pela sua polaridade, pela polaridade da fase estacionária e pela natureza dos compostos da amostra. Enquanto, a componente MS ioniza as moléculas desses compostos e separa-os de acordo com a razão massa/carga³⁰.

Quando se pretende associar a cromatografia líquida à espectrometria de massa, surgem problemas na sua interface. A fonte de ionização é a interface que resolve a incompatibilidade entre as duas técnicas³⁹.

Na grande maioria das vezes, a fonte de ionização faz parte do espectrómetro de massa, sendo então este constituído pela fonte de ionização, o analisador de massa e o detector de iões. Na fonte de ionização, as moléculas que compõem a amostra são convertidas em iões, antes de serem impulsionadas electrostaticamente para o analisador de massa.

No trabalho apresentado nesta dissertação utilizou-se a fonte de ionização por electrospray (ESI). Assim sendo, a produção de iões em ESI requer essencialmente dois passos: primeiro, ocorre uma dispersão de gotas altamente carregadas quase à pressão atmosférica, seguida da sua evaporação. As soluções são primeiramente pulverizadas electrostaticamente, com formação de gotas pequenas e altamente carregadas positivamente ou negativamente. A nebulização da solução é facilitada pelo gás nebulizador. No segundo passo, as moléculas do analito devem, de alguma forma, ser separadas do solvente na forma de iões, em que as sucessivas explosões de gotículas levam à formação de iões na fase gasosa^{29,39}.

O analisador de massa é um dos componentes fundamentais da espectrometria de massa, capaz de separar os iões na fase gasosa consoante a sua razão massa/carga, sendo posteriormente detectados. O detector tem a função de converter a energia iónica em sinais eléctricos transmitidos a um software específico. A resposta do detector para cada componente é assinalada na forma de um cromatograma. A figura 14 ilustra a esquematização de um sistema típico de LC-MS-MS.

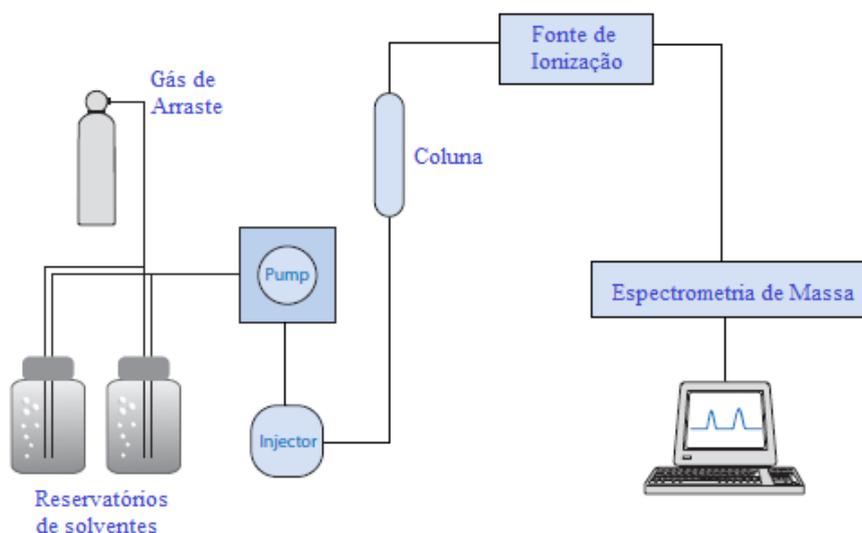


Figura 14 – Esquema de um sistema típico de LC-MS-MS.

No caso do analisador de massa ion trap, as análises MS-MS podem ser implementadas de forma sequencial no tempo, isto é, o ião precursor é mantido no interior da armadilha, enquanto os outros são injectados. Seguidamente uma radiofrequência é aplicada para isolar os iões e excita-los enquanto são bombardeados com moléculas de hélio, com o objectivo de fragmentá-los; após a fragmentação, é aplicada novamente uma radiofrequência para seleccionar o ião pretendido e quantificá-lo, repetindo-se o processo sucessivamente³⁹.

A utilização da técnica hifenada LC-MS-MS possibilita o controlo do ião molecular e das transições electrónicas provenientes da fragmentação do mesmo. A monitorização de iões seleccionados ou a monitorização de uma reacção seleccionada (SRM) garantem a sensibilidade e especificidade necessária para a quantificação de analitos.

1.3.6. Método de extracção em fase sólida (SPE)

Os métodos de extracção em fase sólida permitem a análise de diversos compostos em diferentes matrizes, no caso das formulações farmacêuticas a sua utilização permite a remoção de sais. Como já foi referido, os aminoglicosídeos têm um comportamento fortemente hidrofílico, devido à presença de grupos amino e hidroxilo na sua estrutura química. Estes antibióticos são insolúveis em líquidos imiscíveis com água, assim a extracção clássica líquido-líquido com solventes orgânicos é difícil. Sendo a SPE uma tecnologia adequada para o isolamento destes compostos polares²⁵.

A extracção em fase sólida consiste num processo de separação através do qual os compostos que se encontram dissolvidos ou suspensos numa mistura líquida, são separados de acordo com as suas propriedades químicas e físicas.

O procedimento da SPE inicia-se pelo condicionamento da coluna. Seguindo-se a filtração da amostra líquida sob vácuo, através de uma coluna de extracção, onde os analitos são retidos pelo adsorvente. A etapa seguinte é a lavagem da coluna de extracção com o mesmo solvente utilizado no seu condicionamento a fim de remover impurezas. Por fim efectua-se a eluição dos analitos com um solvente ou uma mistura de solventes adequados, como ilustra a figura 15⁴⁰.

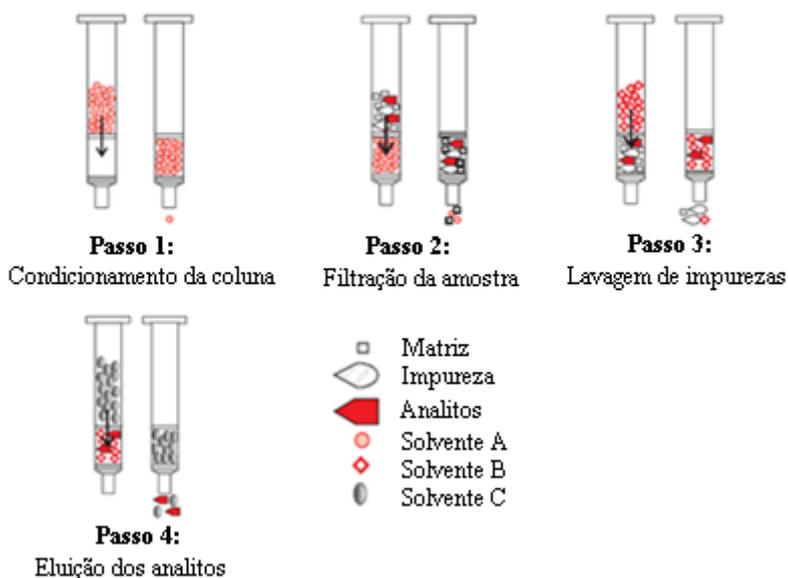


Figura 15 – Etapas do processo de extração em fase sólida.

1.4. Estudos de estabilidade nos medicamentos

A eficácia e a segurança de um medicamento estão relacionadas com a capacidade em manter ao longo do prazo de validade a dosagem terapêutica sem que ocorra um aumento significativo da sua toxicidade, e conseqüentemente a formação de possíveis produtos de degradação.

Os testes de estabilidade são empregues no desenvolvimento dos medicamentos, que segundo a *United States Pharmacopieial Convention* são reconhecidos cinco tipos de estabilidade: química, cada ingrediente activo mantém a sua integridade química dentro dos limites especificados, a estabilidade química dos excipientes deve ser igualmente assegurada; física, as propriedades físicas originais incluindo a aparência, sabor uniforme, dissolução e suspensão devem manter-se; microbiológica, devem ser mantidos dentro dos limites especificados a sua esterilidade ou resistência ao crescimento de microorganismos; terapêutica, o efeito terapêutico deve permanecer inalterado; toxicologia, não se pode verificar um aumento significativo da toxicidade⁴¹.

Os ensaios de estabilidade podem ser realizados sob diversas vertentes, nomeadamente, na degradação forçada (stress testing), no desenvolvimento/optimização de formulações, ensaios clínicos e no âmbito da aprovação de produtos comercializados. Destaca-se a degradação forçada, tendo como objectivo a caracterização da estabilidade de substâncias activas e a identificação de produtos de degradação⁴².

De acordo com a guideline ICH Q1AR os estudos de degradação forçada devem ser efectuados num único lote da substância activa, considerando-se o efeito da temperatura, humidade, luz, hidrólise e oxidação.

Neste trabalho realizaram-se estudos de estabilidade da netilmicina, tendo em conta o efeito da temperatura e a exposição à luz solar. A influência da temperatura e da luz é avaliada directamente na substância, no seu estado sólido ou em solução. Pretendendo-se averiguar as suas propriedades físicas e também a formação de possíveis reacções químicas.

Capítulo 2 - Resultados e Discussão

2.1. Metodologia assistida por microondas: monossacarídeos e dissacarídeos

O desenvolvimento de uma metodologia eficaz e robusta para a identificação e quantificação de monossacarídeos e dissacarídeos por GC-MS é uma tarefa difícil devido à sua elevada polaridade, hidrofobicidade e baixa volatilidade. De forma a ultrapassar essa dificuldade foram realizadas reacções de acetilação e silylação por derivatização acelerada por microondas, MAD.

À aplicação da técnica MAD neste tipo de reacções tem-se atribuído diversas vantagens, nomeadamente, diminuição significativa dos tempos reaccionais, optimização da taxa de rendimento, maior selectividade e reprodutibilidade das reacções.

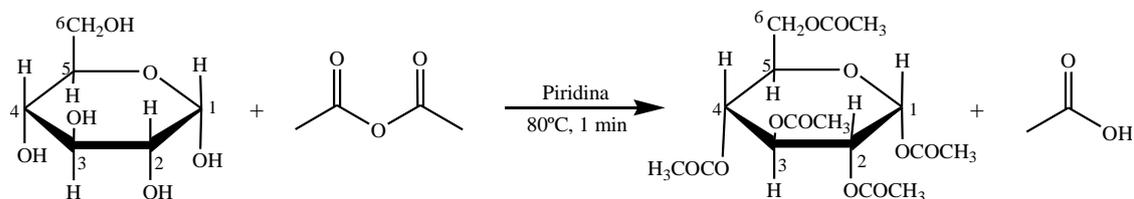
2.1.1. Monossacarídeos

Glucose

Numa primeira abordagem, realizaram-se reacções de acetilação e silição para a glucose de modo a estabelecer condições que permitissem a sua identificação e caracterização por GC-MS.

Diversos métodos têm sido descritos para as reacções de acetilação dos açúcares, por aquecimento convencional. Tipicamente, estas reacções podem ser realizadas à temperatura ambiente com tempos reaccionais de 6 minutos⁴³ até 24 horas⁴⁴. Neil Price⁴⁵ utilizou o aquecimento convencional para derivatização de hidratos de carbono numa mistura de anidrido acético:piridina:diclorometano (1:1:1) a uma temperatura de 60°C durante 1 hora.

Deste modo, aplicou-se a técnica MAD na reacção de acetilação da glucose com piridina e anidrido acético, reduzindo o tempo de reacção, sendo necessário apenas 1 minuto a uma temperatura de 80°C. Resultando um produto oleoso esbranquiçado com um rendimento de 77% sendo caracterizado por RMN protónico, cujos dados se apresentam no capítulo 3 da secção Procedimento Experimental. O mecanismo para esta reacção encontra-se representado no esquema 3.



Esquema 3 – Reacção de acetilação da *D*-glucopiranosose com anidrido acético.

Os grupos hidroxilos da glucose actuam como nucleófilo atacando o grupo carbonilo do anidrido acético, formando ésteres, permitindo a redução da polaridade e aumento da volatilidade da amostra. A utilização do solvente piridina nas reacções de acetilação facilita o ataque nucleofílico entre a glucose e o anidrido acético, actuando como um neutralizador do ácido acético que se forma como produto secundário.

Estabeleceram-se dois métodos cromatográficos de GC-MS descritos no capítulo 3 da secção Instrumentação. Com o método A obteve-se o cromatograma que se apresenta na figura 16 com tempos de retenção de 11,24 e 11,93 minutos.

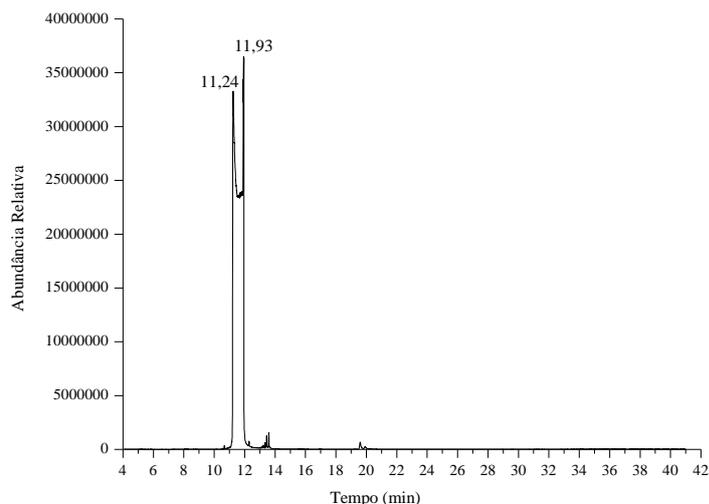


Figura 16 – Cromatograma da *D*-glucopiranosose acetilada analisada pelo método A.

Os espectros de massa correspondentes a cada um dos picos cromatográficos encontram-se ilustrados nas figuras 17 e 18, com a identificação dos principais fragmentos obtidos.

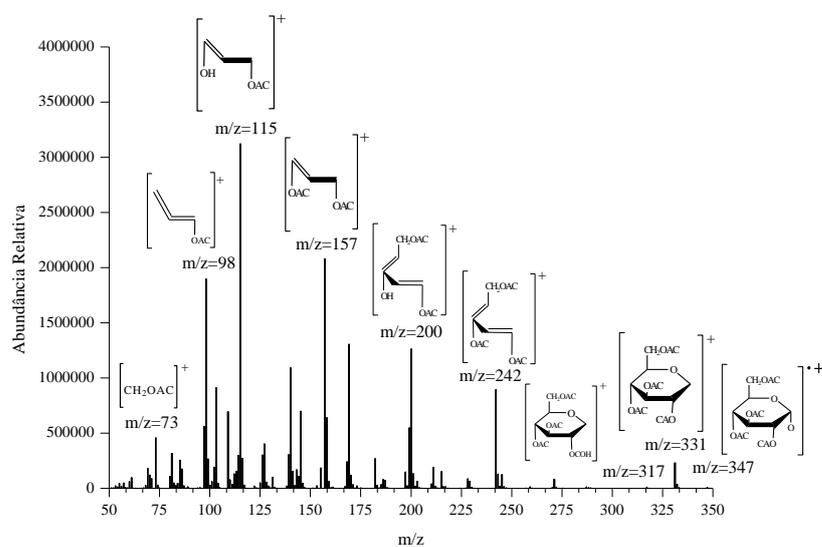


Figura 17 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 11,24 minutos para a α -*D*-glucopiranosose acetilada analisada pelo método A.

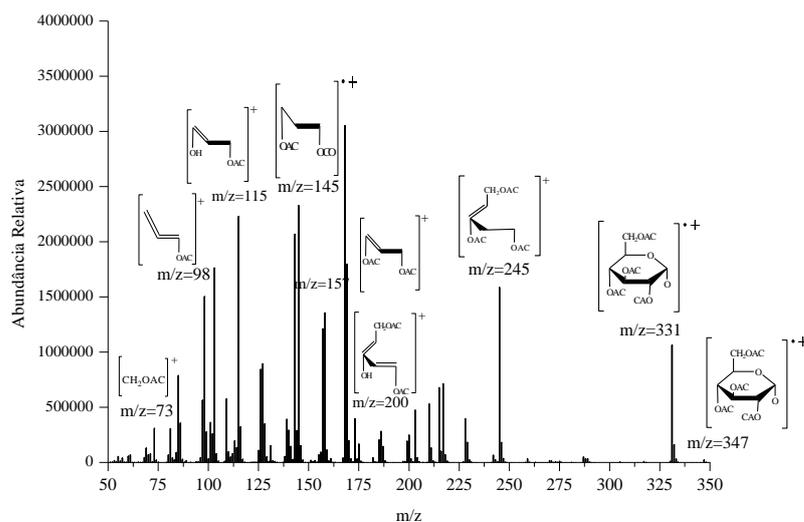


Figura 18 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 11,93 minutos, para a β -*D*-glucopiranosose acetilada analisada pelo método A.

Analisando o cromatograma e seus respectivos espectros, verifica-se que estão concordantes com estudos realizados por Ivan Simkovic⁴⁴ e por Neil Price⁴⁵. Segundo estes autores, o cromatograma da glucose acetilada apresenta dois isômeros, podendo-se fazer a seguinte atribuição, o primeiro tempo de retenção 11,24 minutos corresponde α -*D*-glucopiranosose e o segundo tempo de retenção 11,93 minutos, indica o isômero β -*D*-glucopiranosose.

Os dois espectros de massa revelam a ausência do pico correspondente ao ião molecular [$M^+ = 390$], no entanto, ambos têm presente o pico mássico de m/z 347 que caracteriza a glucose acetilada. A perda de um grupo acetato [$COOCH_3$]⁺ do carbono C-1 da *D*-glucopiranosose acetilada origina o fragmento de m/z 331. Apesar da fraca intensidade do pico de m/z 317 (figura 17), este é considerado importante na identificação da glucose acetilada. A presença dos picos de m/z 200 e 242 indicam que a glucose se encontra na forma de piranosose. Quando o fragmento de m/z 242 que contém os carbonos C-2 a C-6 da molécula original perde um grupo acilo, 42 unidades de massa atômica (u.m.a.), resulta o pico de m/z 200. O mesmo acontece com o fragmento de m/z 157 que ao perder 42 u.m.a resulta o pico de m/z 115. Na figura 18 é possível ainda identificar o pico de m/z 145 e 245.

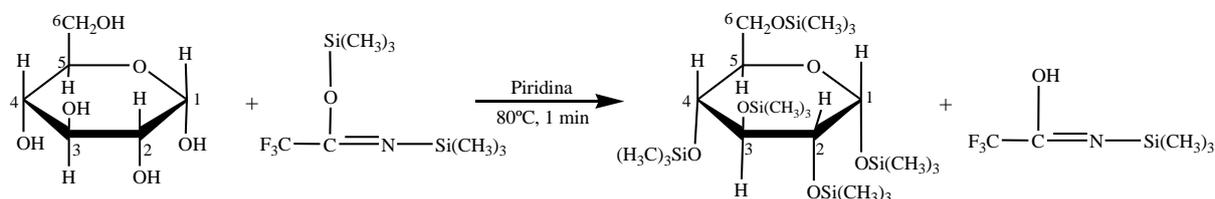
A reacção de acetilação da glucose também foi estudada pelo método B estabelecido para a técnica hifenada GC-MS, obtendo-se tempos de retenção de 66,02; 66,08; 66,89 e 67,44 minutos respectivamente, com um tempo de execução superior ao

método A. Os vários tempos de retenção indicam a presença das diferentes formas de glucose acetilada, nomeadamente, em cadeia aberta ou cíclica, piranose (α e β) ou furanose (α e β)⁴⁵, os seus espectros de massa apresentam fragmentos semelhantes aos obtidos pelo método A.

São vários os exemplos da literatura que empregam as reacções de sililação para a derivatização de açúcares usando o aquecimento convencional. Tal como o procedimento descrito por Patrícia Medeiros², que utiliza o derivatizante BSTFA a uma temperatura de 70°C durante 3 horas. No entanto, o autor Fabiano Silva⁴⁶ ao realizar a derivatização de açúcares e ácidos gordos a partir de frutos cítricos, com derivados trimetilsilil utilizou o microondas doméstico com uma potência de 180 watts, permitindo a redução do tempo da reacção para 4 minutos.

Em 2008, Ruyi Xue e seus colaboradores⁴ determinaram níveis de glucose no sangue, utilizando um procedimento de derivatização com MSTFA-TMCS aplicando a técnica MAD durante 3 minutos e por aquecimento convencional durante 30 minutos a uma temperatura de 120°C. Tentou-se implementar este procedimento com a técnica MAD modificando o agente derivatizante, no entanto, apesar do tempo de derivatização ser menor que os dos métodos com aquecimento convencional, não foi possível obter uma derivatização razoável com a ausência do solvente.

Assim, a glucose foi dissolvida em piridina adicionando-se BSTFA-TMCS, sendo colocada no vaso reaccional do microondas durante 1 minuto a uma temperatura de 80°C, obtendo-se um produto oleoso transparente com um rendimento de aproximadamente 53%. No esquema seguinte, encontra-se ilustrado o mecanismo da reacção de sililação da glucose.



Esquema 4 – Reacção de sililação da *D*-glucopirranose com BSTFA-TMCS.

Na reacção de sililação os hidrogénios dos grupos hidroxilo da glucose são substituídos pelo grupo trimetilsilil, ocorrendo a formação de grupos funcionais éteres.

A amostra resultante da reacção foi posteriormente analisada pelo método B estabelecido na técnica GC-MS, obtendo-se o cromatograma apresentado na figura 19.

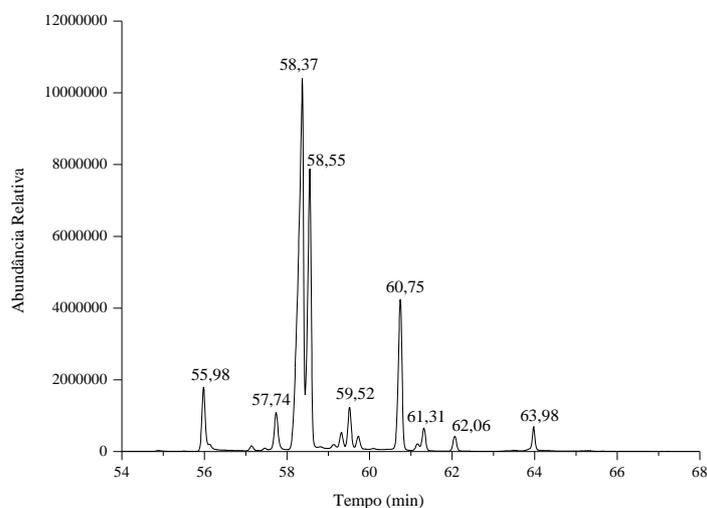


Figura 19 – Cromatograma da *D*-glucopiranosose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

A maioria dos monossacarídeos apresenta cinco formas isoméricas, nomeadamente: duas em piranoses (α e β), duas em furanoses (α e β) e uma forma em cadeia aberta, indicando que o cromatograma apresenta vários picos cromatográficos, dificultando a identificação dos tempos de retenção que corresponde a cada estrutura⁴⁷.

Segundo um estudo realizado por Martínez Castro⁴⁸, nas formas piranose, o anómero β apresenta um maior tempo de retenção que o anómero α , devido aos seus grupos OTMS se encontrarem nas posições equatoriais.

A figura 20 permite a visualização do espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 58,37 minutos.

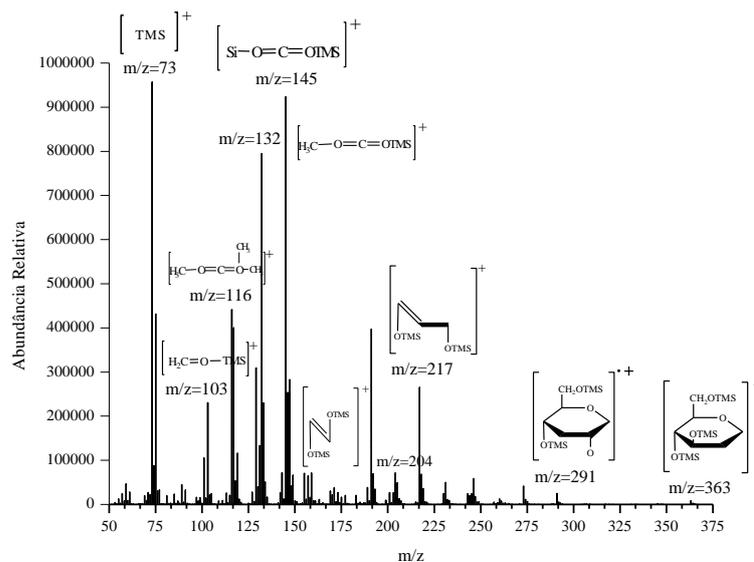


Figura 20 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 58,37 minutos, para a *D*-glucopiranosose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

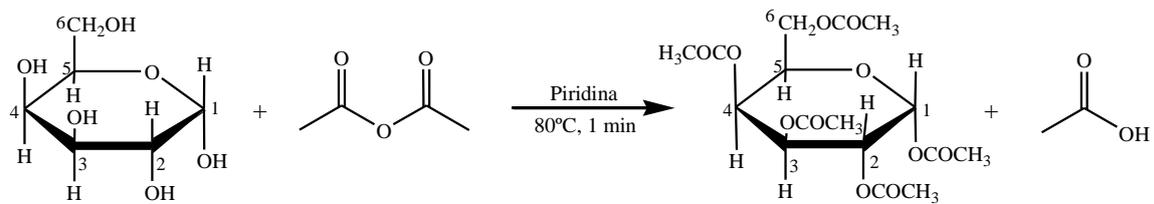
Pela análise do espectro de massa, observa-se a ausência do íon molecular [$M^+ = 540$] da *D*-glucopiranosose sililada, no entanto, a perda de dois grupos OTMS gera o pico mássico de m/z 363 visível no espectro de massa. O fragmento de m/z 291 também é um pico característico da glucose sililada, resultando da perda de dois grupos OTMS e de um grupo trimetilsilil.

Alguns autores^{2,47,49}, sugerem que a presença dos fragmentos iônicos de m/z 217 e 204 são típicos da forma piranosose. Observando-se ainda, que a perda de 29 unidades de massa atômica é considerado um salto característico do fragmento de m/z 145 para o 116, ocorrendo o mesmo princípio do pico de m/z 132 para 103.

Ambas as reacções foram repetidas três vezes para o método B da técnica cromatográfica GC-MS. Os resultados obtidos para as reacções de acetilação mostram que o tempo de retenção é de $65,94 \pm 0,01$ minutos. Nas reacções de sililação os tempos de retenção estão compreendidos entre 55 a 64 minutos.

Galactose

A galactose foi dissolvida em piridina adicionando-se anidrido acético. A reacção foi colocada no vaso reaccional do microondas durante 1 minuto a 80°C , obtendo-se um rendimento com valor de 78%. O esquema 5 representa o mecanismo de reacção da galactose com anidrido acético.



Esquema 5 – Reacção de acetilação da *D*-galactose com anidrido acético.

A figura 21 e 22 indicam o cromatograma e o espectro de massa da galactose acetilada pelo método B da técnica GC-MS.

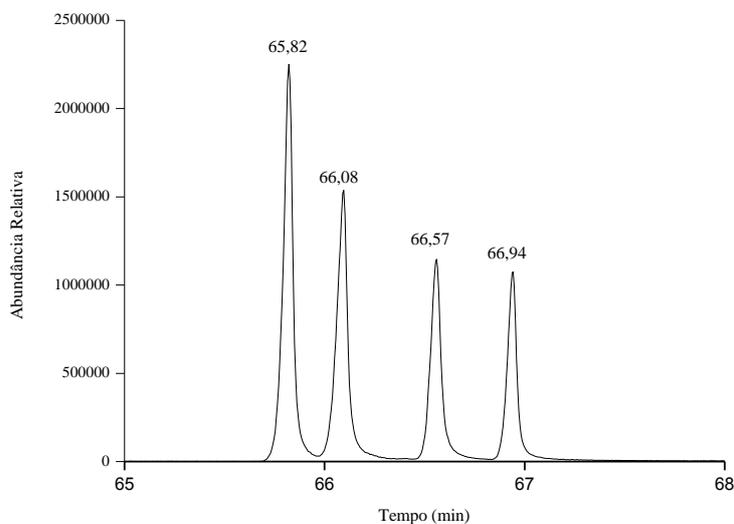


Figura 21 – Cromatograma da *D*-galactopirranose acetilada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

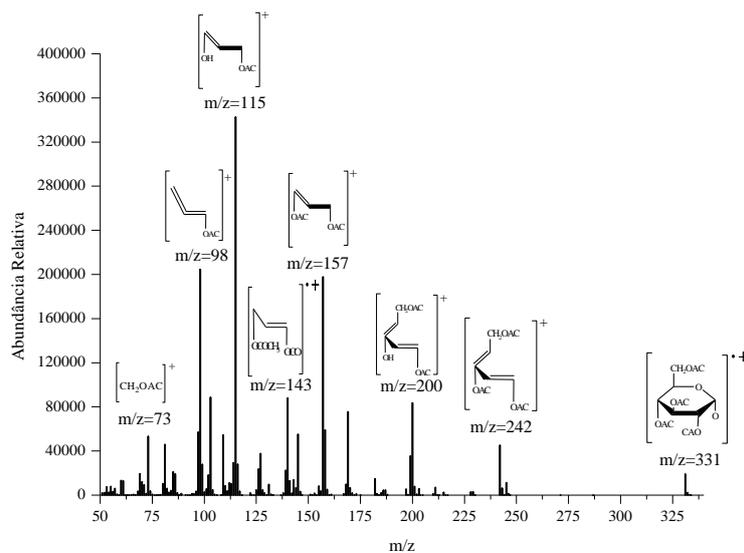
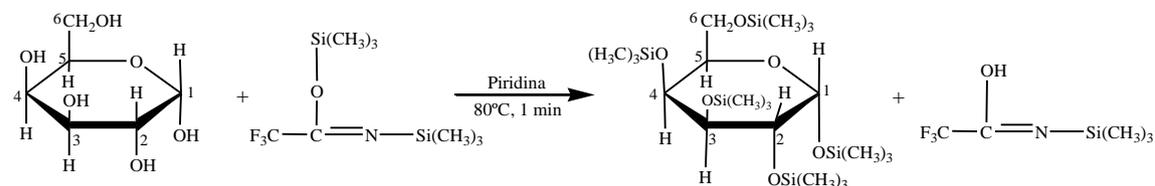


Figura 22 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção minutos, para a *D*-galactopirranose acetilada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

Este monossacarídeo difere da estrutura química da *D*-glucose no carbono C-4, apresentando um espectro de massa com fragmentos idênticos ao espectro da *D*-glucose acetilada (figura 17 e 18), encontrando-se os seus fragmentos identificados na figura 22.

No entanto, é possível distinguir estes dois monossacarídeos pelos seus tempos de retenção, em que a *D*-galactose apresenta o seu primeiro tempo de retenção aos 65,82 minutos, enquanto a *D*-glucose aos 65,94 minutos, havendo um intervalo de tempo muito curto, diferindo apenas 0,12 minutos.

A reacção de sililação consistiu na adição de piridina e BSTFA-TMCS à galactose, sendo colocada no microondas a uma temperatura de 80°C durante 1 minuto, resultando um produto oleoso transparente com um rendimento de aproximadamente 59% (esquema 6).



Esquema 6 - Reacção de sililação da *D*-galactose com BSTFA-TMCS.

A reacção foi analisada pelo método B da técnica GC-MS originando o cromatograma da figura 23 e o espectro de massa da figura 24 correspondente ao tempo de retenção 62,10 minutos.

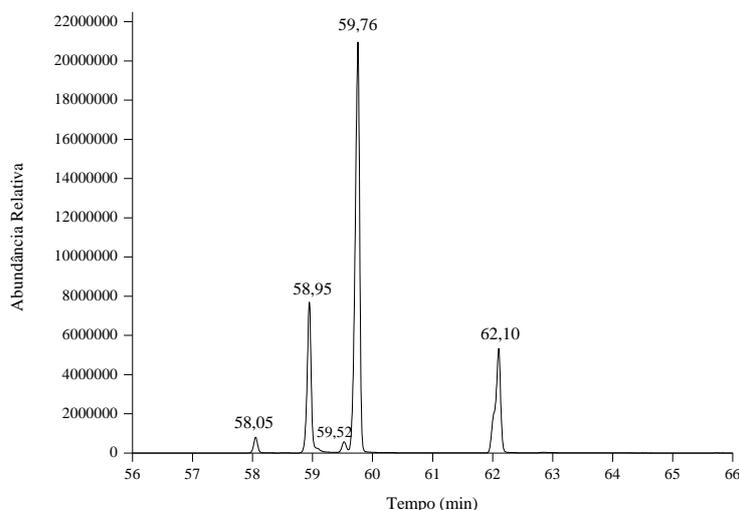


Figura 23 – Cromatograma da *D*-galactopiranosose sililada com BSTFA-TMCS analisado pelo método B da técnica GC-MS.

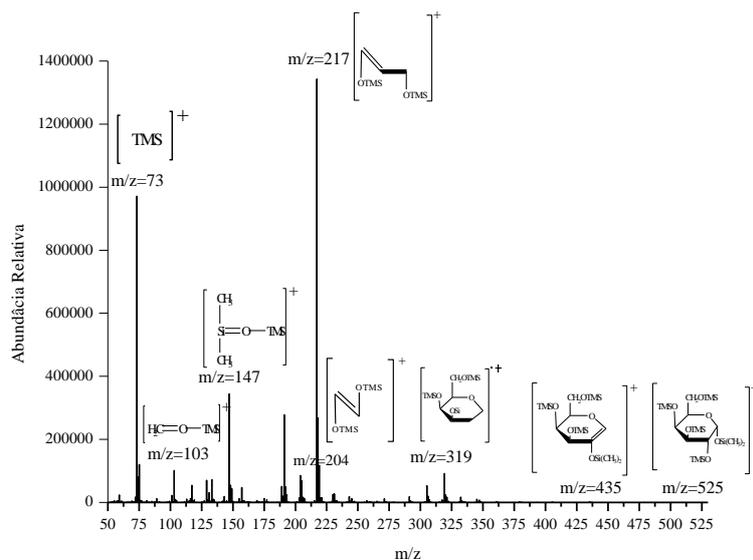
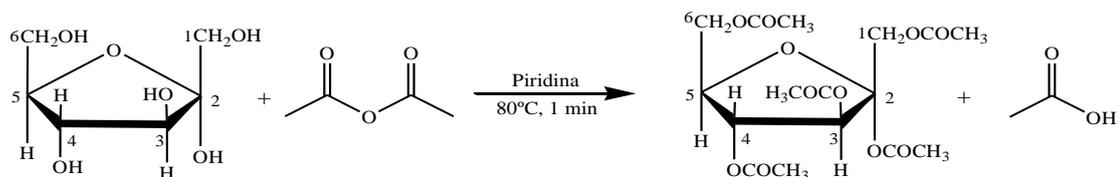


Figura 24 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 62,10 minutos, para a D-galactopiranosose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

Analisando o cromatograma da figura 23 verifica-se cinco tempos de retenção indicando que este monossacarídeo pode apresentar duas formas em piranose (α e β), duas formas em furanoses (α e β) e uma em cadeia aberta. A *D*-galactose difere da estrutura da *D*-glucose na configuração do carbono C-4, tendo os seus espectros de massa fragmentações semelhantes. Todavia, a *D*-galactose apresenta o seu primeiro tempo de retenção aos 58,05 minutos, enquanto na *D*-glucose sililada o primeiro tempo de retenção surge 2,07 minutos antes, permitindo assim a identificação deste monossacarídeo. No espectro de massa observa-se a *D*-galactose sililada com menos um grupo metil que corresponde ao pico mássico de m/z 525.

Frutose

O procedimento experimental da reacção de acetilação optimizado foi posteriormente aplicado à frutose, resultando um produto oleoso esbranquiçado com um rendimento aproximadamente de 79%. No esquema 7 encontra-se a representação esquemática da reacção de acetilação da frutose.



Esquema 7 – Reacção de acetilação da D-frutose com anidrido acético.

O produto da reacção foi caracterizado por RMN protónico obtendo-se o espectro apresentado na figura 25. A figura 26 é uma ampliação do espectro anterior na região entre 3 e 6 ppm.

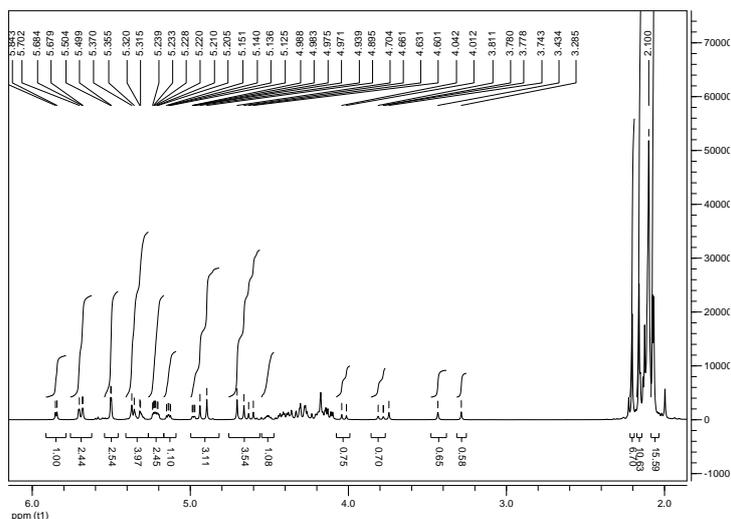


Figura 25 – Espectro de RMN ¹H correspondente à frutose acetilada.

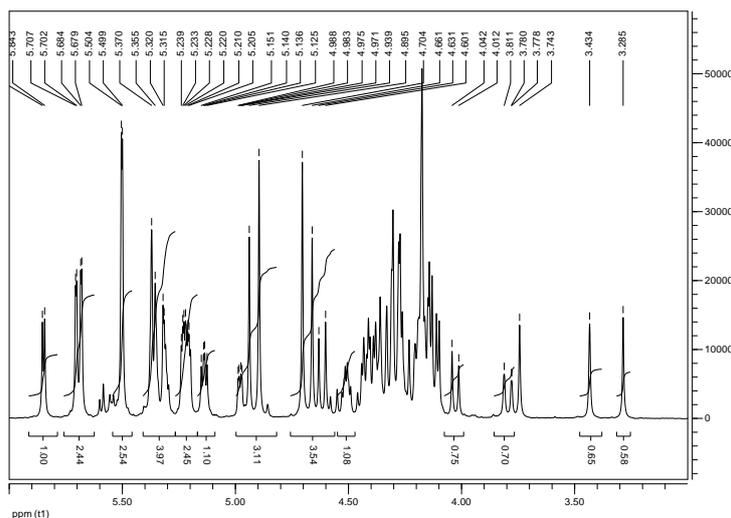


Figura 26 – Espectro de RMN ¹H ampliado entre 3-6 ppm correspondente à frutose acetilada.

Analisando os espectros de RMN protónico e tendo em consideração o que se encontra descrito na literatura⁵⁰, para o desvio químico do dubleto em 5,85 ppm com

constante de acoplamento de 4,80 Hz atribui-se ao anómero α e para o desvio químico do duplo dubleto em 5,70 ppm com constantes de acoplamento de 9,20 e 2,00 Hz é característico o anómero β . Indicando que a frutose acetilada se pode encontrar na forma α e β nas percentagens 33:66. Na zona com desvios químicos entre 2 a 2,20 ppm, pode evidenciar-se picos típicos correspondentes aos prótons dos grupos acetatos $[\text{COOCH}_3]^+$ que se encontram sobrepostos, dificultando a sua identificação.

Após a caracterização deste monossacarídeo por RMN protónico, foi submetido ao método A (figura 27) e B da técnica GC-MS por impacto electrónico, resultando cromatogramas semelhantes, embora pelo método B o tempo de corrida da amostra seja superior ao método A, com tempos de retenção 57,23; 61,58; 63,78 e 65,69 minutos.

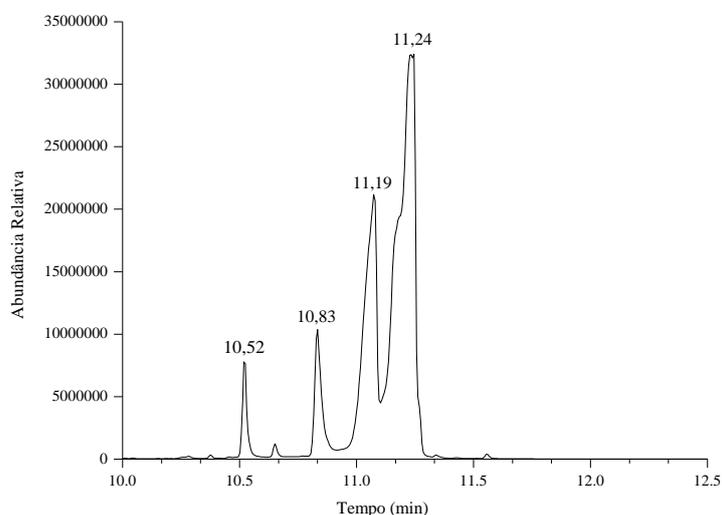


Figura 27 – Cromatograma da frutose acetilada analisada pelo método A da técnica GC-MS.

Pela análise do cromatograma anterior verifica-se a presença de vários picos cromatográficos, indicando que a frutose acetilada se pode encontrar na forma cíclica, piranose (α e β) ou furanose (α e β) e na forma de cadeia aberta, sendo uma das principais dificuldades no estudo destes monossacarídeos⁴⁵.

Tanto pelo método A como pelo método B é possível identificar os principais fragmentos iónicos característicos destas reacções, apresentando espectros de massa idênticos. No método B verifica-se que à medida que o tempo de retenção aumenta é possível obter um maior valor de m/z para o pico mássico. Todavia, análise pelo método A permite identificar o ião molecular $[\text{M}^+ = 390]$ de frutose acetilada como ilustra o espectro de massa da figura 28.

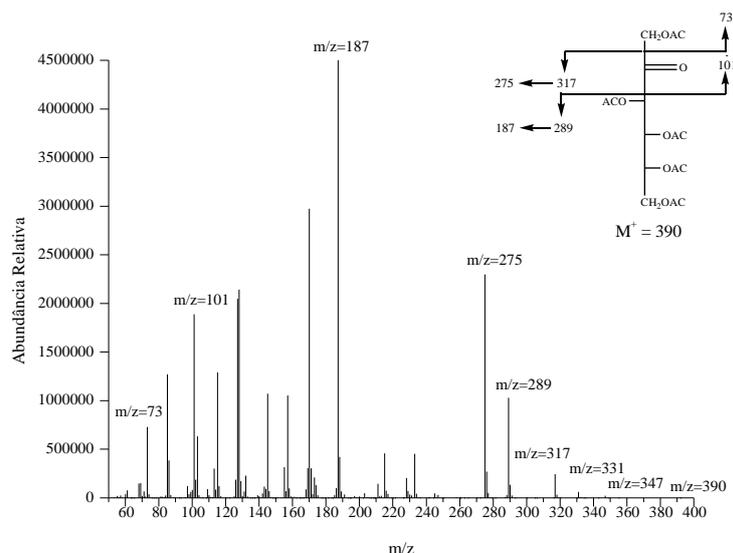
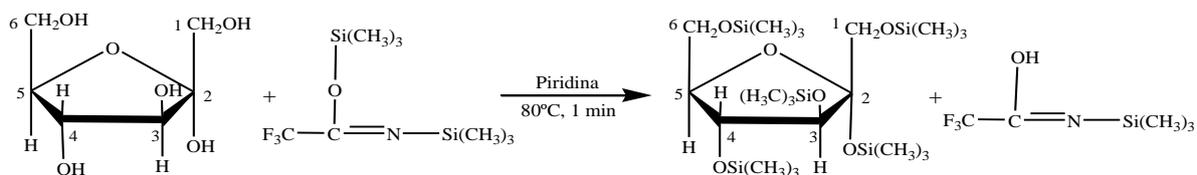


Figura 28 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 11,24 minutos, para a *D*-frutose acetilada analisada pelo método A da técnica GC-MS.

Neil Price⁴⁵ relata que a estrutura mais predominante deste açúcar por GC-MS com ionização por impacto electrónico é de cadeia aberta. Deste modo, os resultados conseguidos por este investigador são semelhantes aos fragmentos iónicos obtidos no espectro de massa anteriormente apresentado. Assim sendo, o pico de m/z 347 [M-COCH₃]⁺ de fraca intensidade resulta da perda de um grupo acilo do ião molecular e o pico de m/z 331 [M-COOCH₃]⁺ da perda de um grupo acetato. Os fragmentos específicos de m/z 317 e 73 surgem da clivagem que ocorre do lado direito e do lado esquerdo do grupo carbonilo a partir do C1-C2, e os picos de m/z 101 e 289 a partir da clivagem dos C2-C3. O fragmento de m/z 317 perde 42 unidades de massa atómica originando o pico secundário de m/z 275. Em relação ao fragmento de m/z 289, este perde 102 u.m.a resultando o pico m/z de 187.

Em relação à reacção de silição, consistiu na adição de piridina e BSTFA-TMCS à frutose, posteriormente colocada no microondas a uma temperatura de 80°C durante 1 minuto (esquema 8), originando um produto oleoso transparente com um rendimento de aproximadamente 57%.



Esquema 8 – Reacção de sililação da *D*-frutose com BSTFA-TMCS.

Da mesma forma que sucede com a reacção da glucose com os derivados trimetilsilil, ocorre a formação de grupos funcionais éteres. A figura 29 retrata o cromatograma obtido pelo método B da técnica GC-MS com os seus respectivos tempos de retenção.

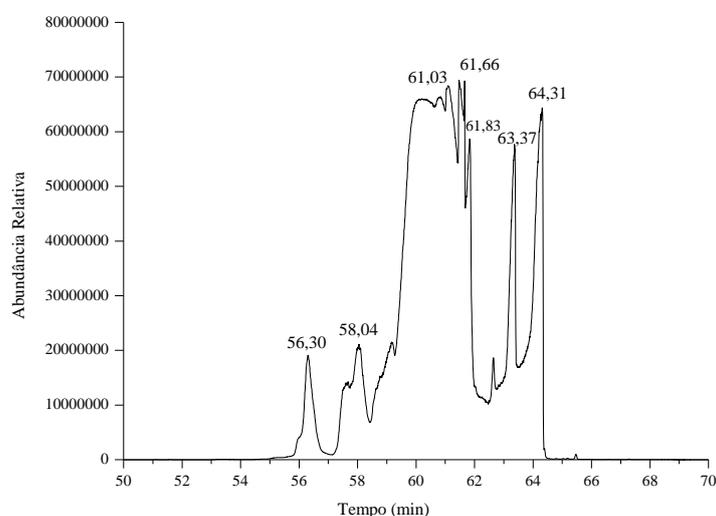


Figura 29 – Cromatograma da *D*-frutose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

Tendo em conta os estudos executados pelos investigadores supracitados^{47,48}, relatando que a presença de vários picos cromatográficos indicam a existência de várias formas isoméricas da frutose sililada.

Analisando os espectros de massa de cada tempo de retenção verifica-se que estes apresentam a mesma fragmentação, assim a figura 30 ilustra o espectro de massa para o tempo de retenção 61,66 minutos.

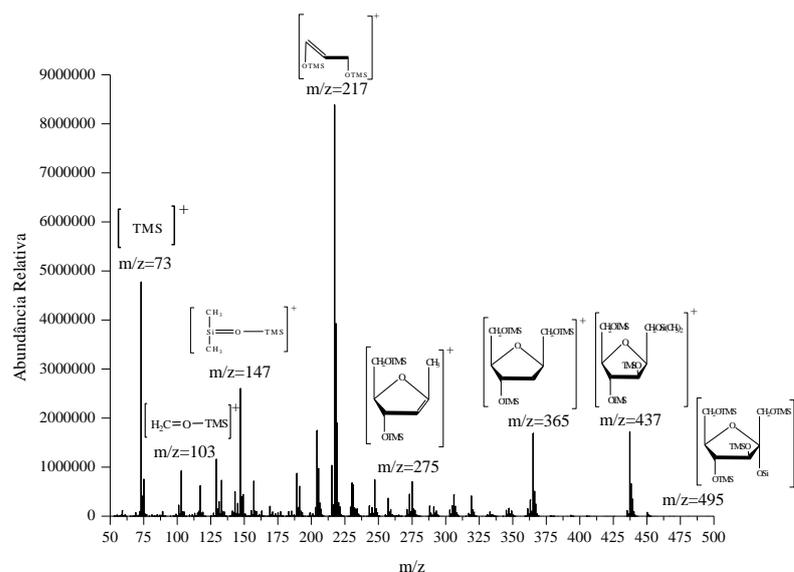


Figura 30 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 61,66 minutos para a α -D-frutofuranose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

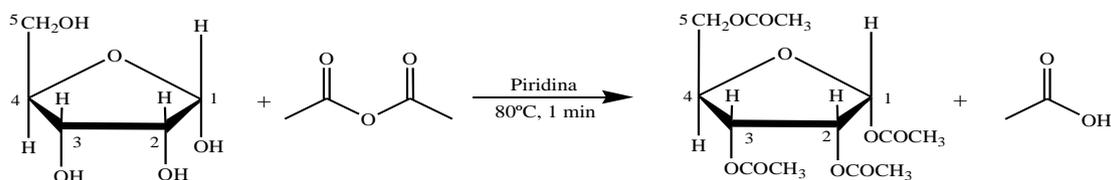
Tendo por base os estudos realizados por Patrícia Medeiros² e O. Chizhov⁴⁹ para identificação de hidratos de carbono com derivados trimetilsilil, foi possível identificar os principais fragmentos da reacção de sililação da frutose.

Segundo estes investigadores, o espectro de massa dos monossacarídeos com um anel furanose são caracterizados pelo pico de m/z 217 com elevada intensidade, verificando-se a sua existência no espectro de massa da figura 30. Observa-se a ausência do ião molecular [$M^+ = 540$], no entanto, encontra-se o pico mássico com valor de m/z 495 que resulta da perda de três grupos metil de um dos TMS. O fragmento com m/z 437 é típico de uma cetose, segundo estudos realizados pelo grupo de investigação de Garcia Raso⁵¹. A presença de picos relativamente intensos de m/z 275, 365 também são característicos deste açúcar. Neste caso, tendo em conta a semelhança entre o espectro de massa obtido e os estudados realizados por Patrícia Medeiros², pode considerar-se que o monossacarídeo é α -D-frutofuranose sililada.

As reacções de acetilação e sililação da frutose foram repetidas três vezes cada uma e analisadas pelo método B da técnica hifenada GC-MS, indicando que nas reacções de acetilação os tempos de retenção estão compreendidos entre 57 a 66 minutos. Na sililação os tempos de retenção encontram-se entre 56 a 64 minutos.

Ribose

A metodologia desenvolvida para a reacção de acetilação dos monossacárideos estudados foi aplicada à ribose, adquirindo-se um produto amarelo oleoso com um rendimento de 77%. A esquematização desta reacção encontra-se abaixo descrita.



Esquema 9 – Reacção de acetilação da *D*-ribose com anidrido acético.

Como sucede nas reacções de acetilação anteriormente estudadas, há a formação de grupos ésteres, facilitando a identificação destes analitos por cromatografia. A *D*-ribose acetilada foi caracterizada por RMN protónico que se apresenta na figura 31 e 32.

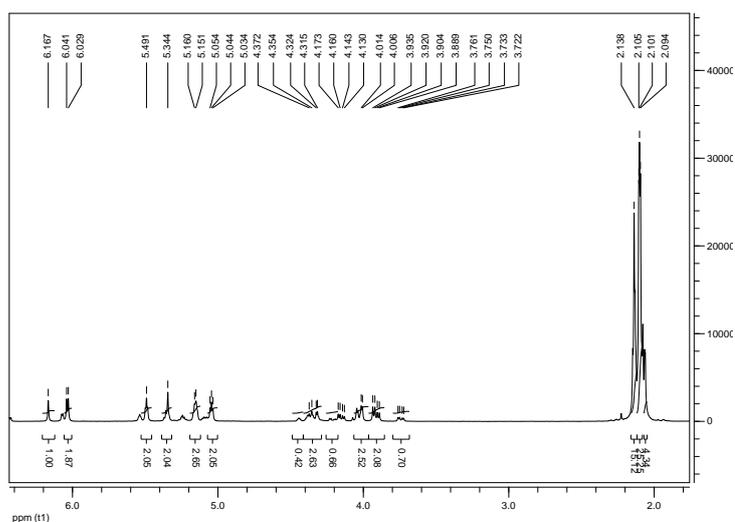


Figura 31 – Espectro de massa RMN ^1H correspondente à *D*-ribose acetilada.

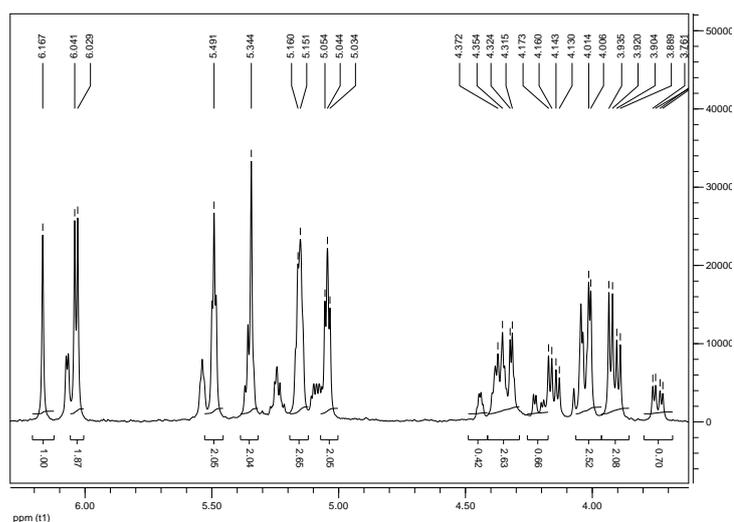


Figura 32 – Espectro de RMN ¹H ampliado entre 3-7 ppm correspondente à *D*-ribose acetilada.

Da análise destes resultados, e comparando-os com os espectro de RMN protónico da frutose acetilada, verifica-se que também a *D*-ribose pode estar nas percentagens de 33:66, no anómero α e β .

No que concerne à *D*-ribose, foi analisada pelo método A estabelecido para técnica de GC-MS, resultando o cromatograma com os respectivos tempos de retenção (figura 33) que apresentam fragmentações idênticas. A figura 34 ilustra o espectro de massa correspondente ao tempo de retenção de 10,39 minutos.

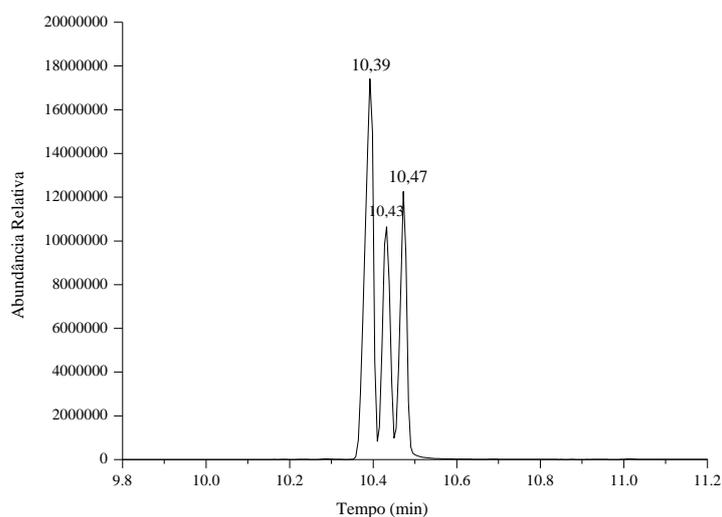


Figura 33 – Cromatograma da *D*-ribose acetilada analisada pelo método A da técnica GC-MS.

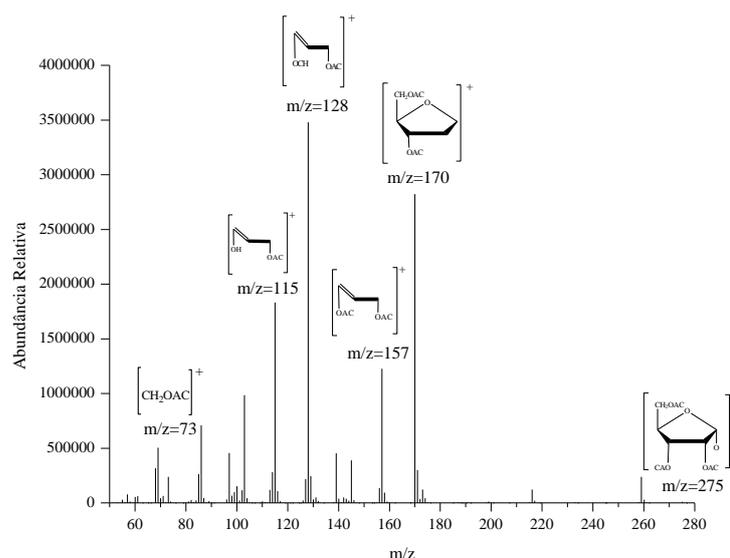


Figura 34 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 10,39 minutos para a *D*-ribose acetilada analisada pelo método A da técnica GC-MS.

Tal como nos anteriores monossacarídeos estudados, estes podem encontrar-se nas formas de cadeia aberta, cíclica e correspondentes isómeros. Pela análise da figura 34 verifica-se a ausência do ião molecular [$M^+ = 318$] da ribose acetilada, tendo como pico mássico o valor de m/z 275 que resulta da perda de um grupo acilo. Apresentando picos de elevada intensidade com valores de m/z 115, 128, 157 e 170, encontrando-se as suas estruturas representadas no respectivo espectro de massa.

De forma a resumir os resultados obtidos anteriormente, a tabela 2 revela os fragmentos iónicos característicos das reacções de acetilação e sililação.

Tabela 2 – Fragmentos iónicos das reacções de acetilação e sililação.

Monossacarídeo	Reacção	Tempo de retenção (min)	Fragmentos m/z
α - <i>D</i> -glucopiranosose	Acetilação	11,24	347, 331, 317, 242, 200, 157, 115, 98
β - <i>D</i> -glucopiranosose	Acetilação	11,93	347, 331, 317, 245, 168, 145, 115, 103, 98
<i>D</i> -galactopiranosose	Acetilação	65,82-66,94*	331, 242, 240, 157, 143, 115, 98
<i>D</i> -frutose	Acetilação	10,52-11,24	390, 347, 331, 317, 289, 275, 187, 101
<i>D</i> -ribose	Acetilação	10,39-10,47	275, 170, 157, 128, 115
<i>D</i> -glucopiranosose	Sililação	55,98-63,98*	363, 291, 217, 204, 145, 132, 116, 103
<i>D</i> -galactopiranosose	Sililação	58,05-62,10*	525, 435, 319, 204, 217, 147, 103
α - <i>D</i> -frutofuranose	Sililação	56,30-64,31*	495, 437, 365, 275, 217, 147, 103

* Método B da técnica GC-MS

2.1.2. Dissacarídeos

Sendo que, o objectivo principal desta parte do trabalho relaciona-se com a seguinte questão: a partir da derivatização obtêm-se espectros de massa característicos de cada açúcar. Sendo assim, é possível analisar dissacarídeos utilizando o mesmo procedimento de derivatização, com o objectivo de conseguir definir a sua composição. Os dissacarídeos objecto de estudo foram a sacarose, lactose e maltose.

Numa primeira abordagem, usaram-se os solventes dioxano e *N,N*-Dimetilformamida (DMF), a fim de dissolver a sacarose, contudo a sua solubilização foi praticamente nula. Alterou-se então os solventes para uma mistura de acetona: água (80:20), mas a solubilização não ocorreu.

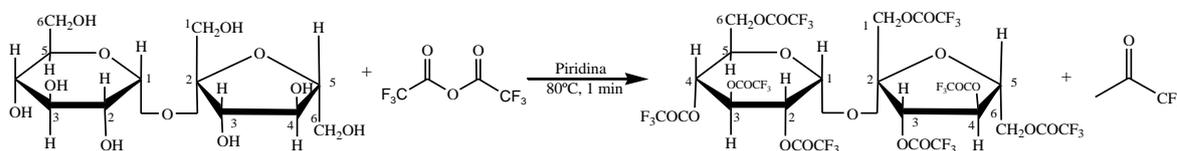
De forma a ultrapassar a dificuldade de solubilização dos dissacarídeos, utilizou-se o solvente piridina, que permitiu uma dissolução completa e eficaz nos dissacarídeos. Efectuou-se um estudo mantendo constante a temperatura a 80 °C, variando o tempo de dissolução da amostra consoante a sua concentração. Prepararam-se soluções de dissacarídeos em piridina por aquecimento em microondas, com uma concentração de 0,15 M de maltose, 0,15 M de sacarose e 0,03 M de lactose. Estas dissoluções podem requerer tempos elevados de irradiação de microondas de 30 a 50 minutos.

Ultrapassadas as dificuldades de solubilização e posterior derivatização, estes compostos foram analisados pelo método B estabelecido para a técnica de GC-MS. Apesar de este método ter um tempo de corrida superior ao método A, com análise total cerca de 90 minutos, revelou ser mais eficaz, devido à rampa de temperatura criada, permitindo uma melhor separação cromatográfica dos analitos.

Sacarose

A sacarose foi primeiramente dissolvida em piridina por irradiação com microondas a uma temperatura de 80°C. Posteriormente realizou-se a reacção de acetilação com anidrido acético a 80°C durante 1 minuto. No entanto, não foi possível obter resultados por GC-MS, contudo realizou-se um TLC, no qual se verificou a formação de produto. A não obtenção de resultados pode dever-se ao facto de os analitos terem ficado retidos na coluna cromatográfica e o tempo de execução do método B não ter sido o suficiente, ou de a reacção não ter sido completa e eficaz.

Optou-se então por se utilizar o derivatizante anidrido trifluoroacético para a reacção de acetilação da sacarose. Obteve-se um produto oleoso esbranquiçado com um rendimento baixo, aproximadamente de 25%. O esquema reaccional encontra-se a seguir.



Esquema 10 – Reacção de acetilação da sacarose com anidrido trifluoroacético.

O grupo carbonilo do anidrido trifluoroacético está mais polarizado que o anidrido acético devido à influência dos três átomos de flúor, muito electronegativos, a sua utilização permitiu complementar este estudo. Visto que não está directamente relacionado com o objectivo principal deste trabalho.

De seguida executou-se o método B da técnica hifenada GC-MS, resultando o cromatograma da figura 35 com um tempo de retenção de 76,77 minutos e o seu respectivo espectro de massa, figura 36.

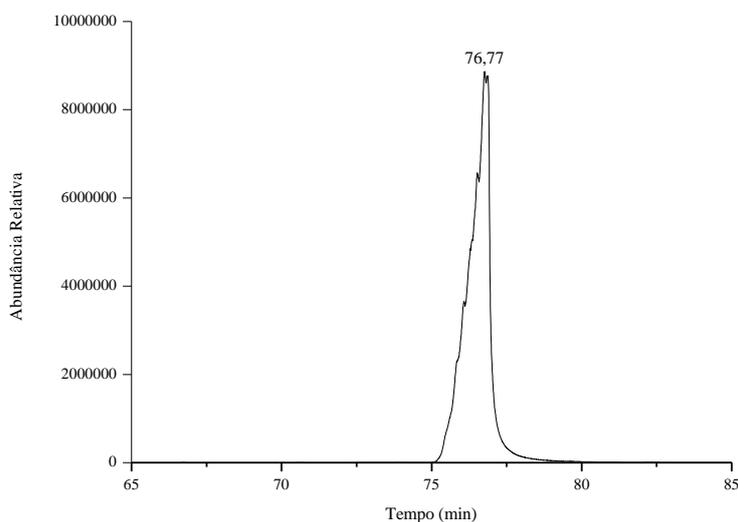


Figura 35 – Cromatograma da sacarose acetilada com anidrido trifluoroacético analisada pelo método B da técnica GC-MS.

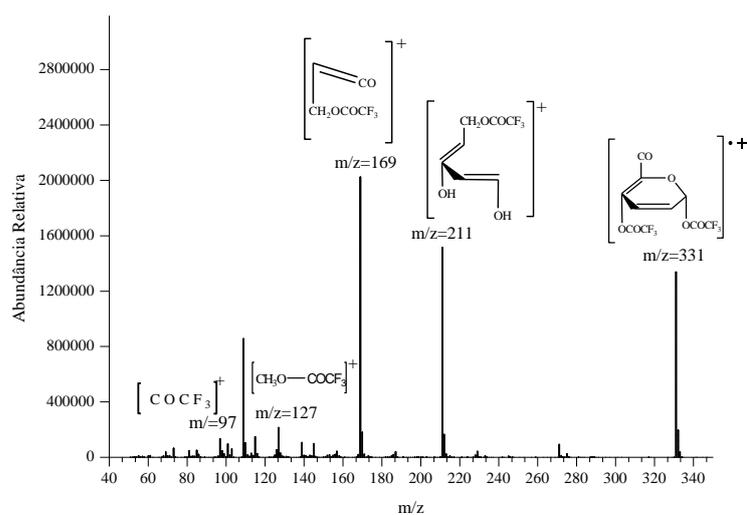
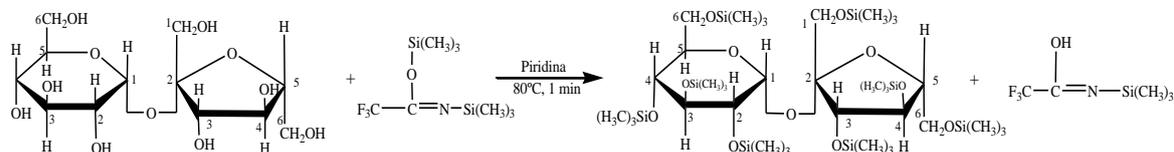


Figura 36 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 76,77 minutos para a sacarose acetilada com anidrido trifluoroacético analisada pelo método B da técnica GC-MS.

Analisando a figura anterior constata-se que apresenta fragmentos iónicos com valores de m/z diferentes dos anteriores, devido à sua estrutura química exibir átomos de flúor. Os principais fragmentos iónicos encontram-se identificados no espectro de massa.

De seguida, realizou-se a reacção de sililação da sacarose, sendo primeiramente dissolvida em piridina a uma temperatura de 80°C , adicionando-se posteriormente o derivatizante. Obtendo-se um produto oleoso transparente com um rendimento relativamente baixo, 23%. A reacção de sililação da sacarose encontra-se descrita no esquema 11.



Esquema 11 – Reacção de sililação da sacarose com BSTFA-TMCS.

Esta reacção foi analisada pelo método B estabelecido para a técnica GC-MS com impacto electrónico cujo cromatograma e o espectro de massa (para o tempo de retenção 80,10 minutos) se encontram ilustrados nas figuras 37 e 38, com os principais fragmentos de massa identificados.

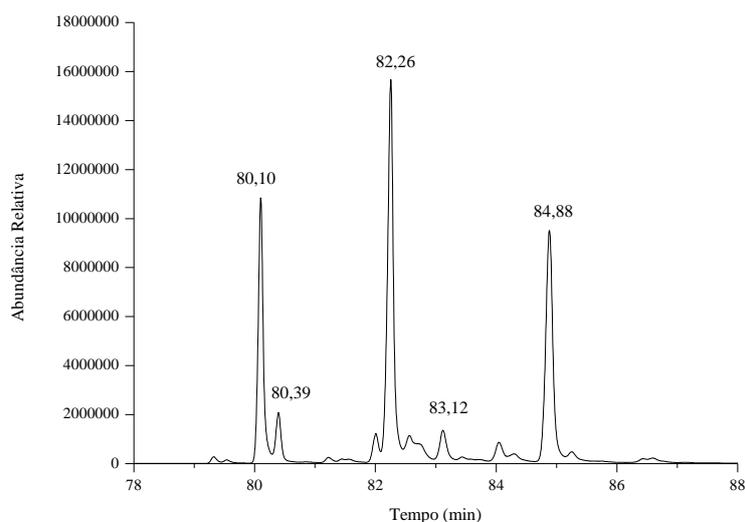


Figura 37 – Cromatograma da sacarose sililada sujeita ao método B da técnica GC-MS.

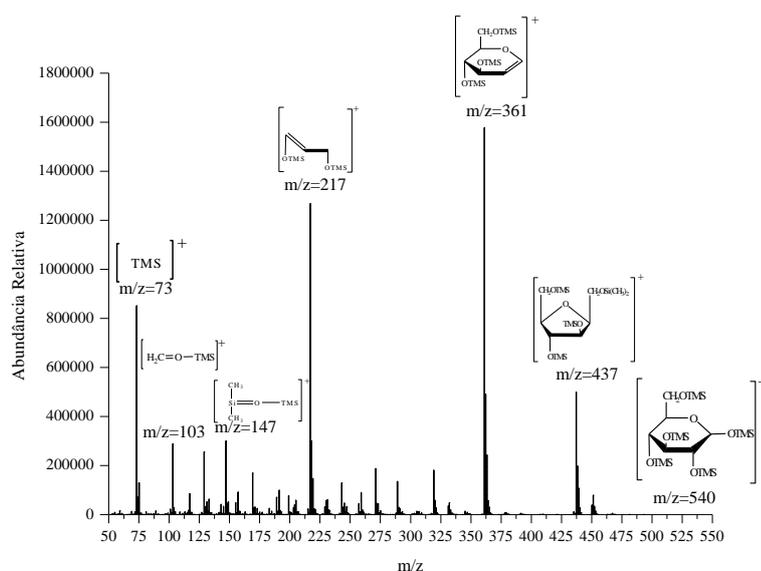


Figura 38 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 80,10 minutos para a sacarose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

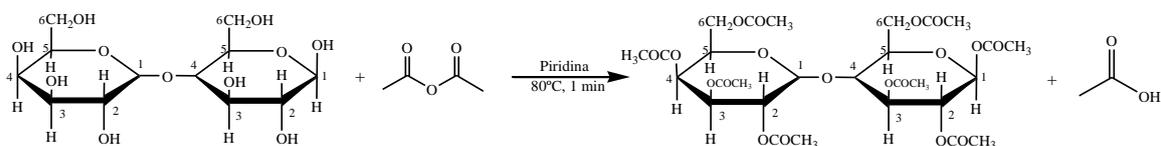
Da literatura ressalta que a presença de vários picos cromatográficos revela que este dissacarídeo se possa encontrar na forma cíclica, piranose ou furanose.

A figura 38 mostra que o pico mássico de m/z 540 pode corresponde à estrutura química 1- α -D-glucopiranose ligada ao grupo OTMS, ou ao monossacarídeo frutose (2- β -D-frutofuranose) ligado ao grupo OTMS. A presença do pico de m/z 437 indica a D-

frutofuranose tal como identificado no espectro da figura 30. O fragmento de m/z 361 com elevada intensidade corresponde à *D*-glucopiranosose identificado na figura 20.

Lactose

A lactose foi primeiramente dissolvida em piridina e posteriormente foi adicionado anidrido acético sendo colocada no microondas a uma temperatura de 80°C durante 1 minuto. Originando um produto com um rendimento de aproximadamente 79% (esquema 12).



Esquema 12 – Reacção de acetilação da lactose com anidrido acético.

A lactose é constituída pelo monossacarídeo *D*-galactose unido por uma ligação do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ à *D*-glucose. A *D*-galactose difere da glucose pela posição que o grupo hidroxilo apresenta no carbono C-4. Este dissacarídeo foi estudado pelo método B da técnica GC-MS obtendo-se o cromatograma (figura 39) com cinco tempos de retenção, demonstrando que a lactose se pode encontrar em diferentes formas isoméricas.

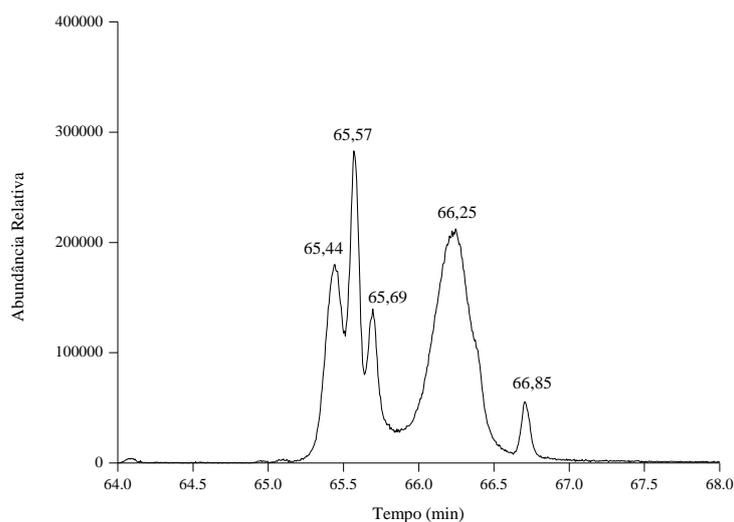


Figura 39 – Cromatograma da lactose acetilada analisada método B da técnica GC-MS.

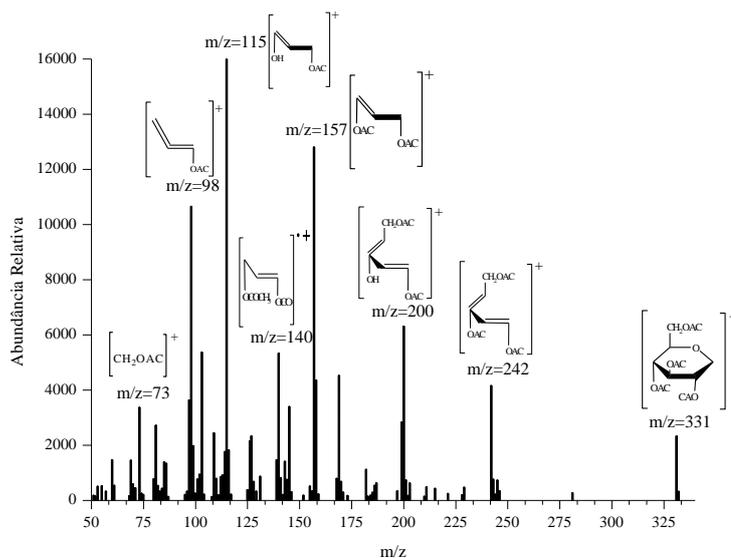
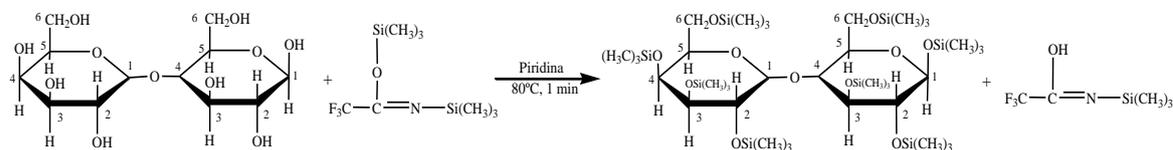


Figura 40 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 65,69 minutos para a lactose acetilada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

Analisando os resultados, verifica-se que o espectro de massa da lactose pode corresponder à *D*-glucopirranose ou à *D*-galactopirranose, visto que os fragmentos de massa que apresenta são característicos de ambos os monossacarídeos. Todavia a identificação do açúcar que constitui este dissacarídeo torna-se difícil, porque este apresenta tempos de retenção entre os 65,44 e 66,25 minutos, tal como sucede com a *D*-glucopirranose e a *D*-galactopirranose.

Seguindo o mesmo procedimento experimental que foi estabelecido para a sacarose, a reacção de sililação da lactose encontra-se ilustrada no esquema 13. O produto resultante com um rendimento de aproximadamente 58% ostentava uma cor transparente com um aspecto oleoso.



Esquema 13 – Reacção de sililação da lactose com BSTFA-TMCS.

Depois da execução da reacção, este composto foi sujeito ao método B do GC-MS, originando o cromatograma da figura 41.

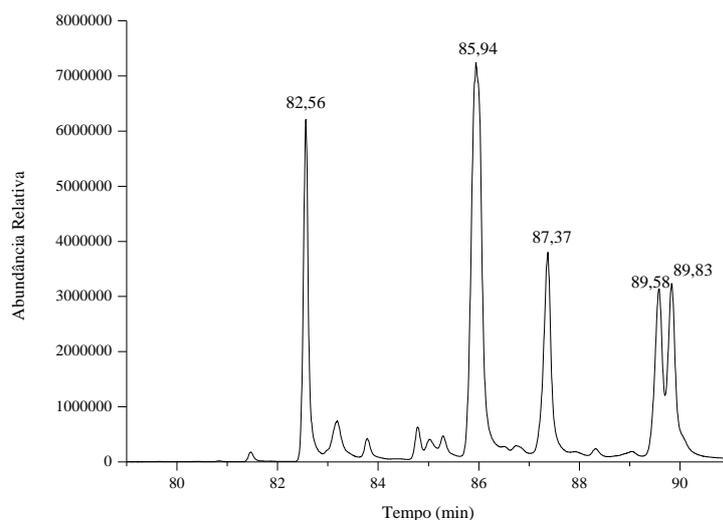


Figura 41 – Cromatograma da lactose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

O cromatograma mostra cinco tempos de retenção. Os espectros de massa correspondentes aos tempos de retenção de 82,56 e 87,37 minutos exibem o fragmento iônico de m/z 217 de elevada intensidade, indicando a existência da forma furanose. Todavia, os restantes tempos de retenção contêm os fragmentos de m/z 217 e 204 indicando que o anel hexagonal é na forma de piranose, como sucedeu com a *D*-glucopiranosose para o tempo de retenção 58,37 minutos (figura 20).

O espectro de massa correspondente ao pico cromatográfico com o tempo de retenção de 85,94 minutos apresenta-se na figura 42.

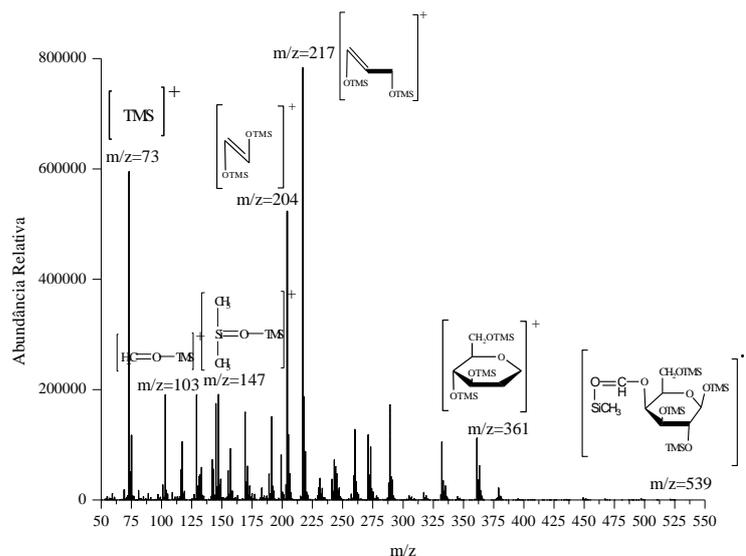
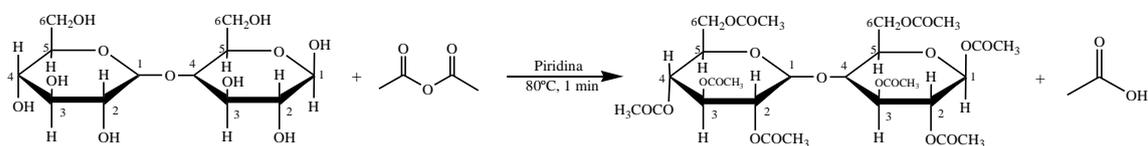


Figura 42 – Espectro de massa do correspondente ao tempo de retenção 85,95 minutos para a lactose sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

De acordo com os resultados obtidos, a comparência do pico mássico de m/z 539 indica a presença da ligação glicosídica entre o monossacarídeo β -*D*-galactose e a β -*D*-glucopiranosose. A presença do fragmento de m/z 361 indica a *D*-glucopiranosose tal como identificado na figura 20. No entanto os restantes fragmentos iónicos indicam que se possa estar na presença da *D*-galactose ou da *D*-glucopiranosose.

Maltose

A metodologia da reacção de acetilação dos dissacarídeos foi a aplicada à maltose, levando à obtenção de um produto oleoso esbranquiçado com um rendimento de 69%. Deste modo, o esquema 14 mostra a reacção da maltose com anidrido acético.



Esquema 14 – Reacção de acetilação da maltose com anidrido acético.

Após aplicação do método B da técnica GC-MS, resultou o cromatograma com um único tempo de retenção, 65,86 minutos e o respectivo espectro de massa.

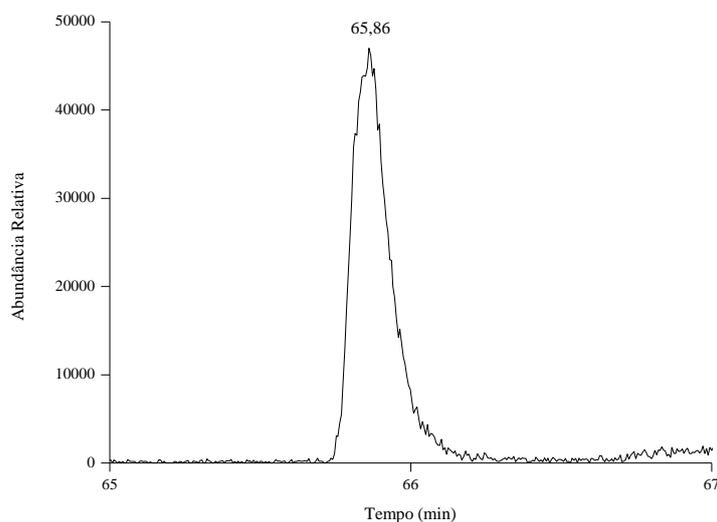


Figura 43 – Cromatograma da maltose acetilada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

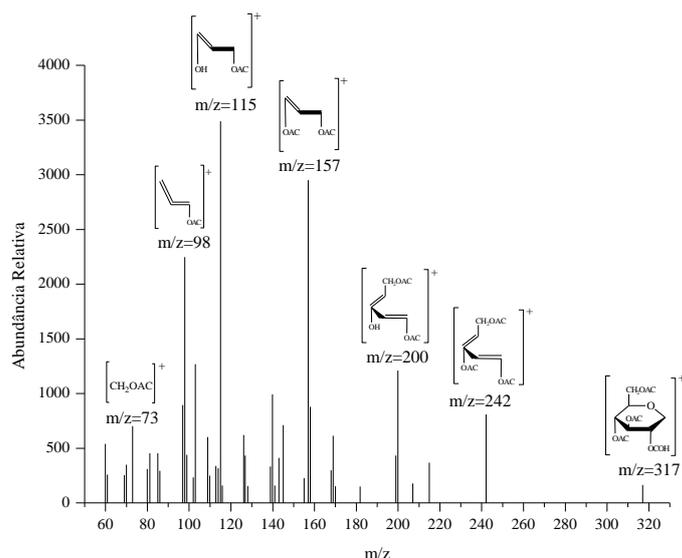
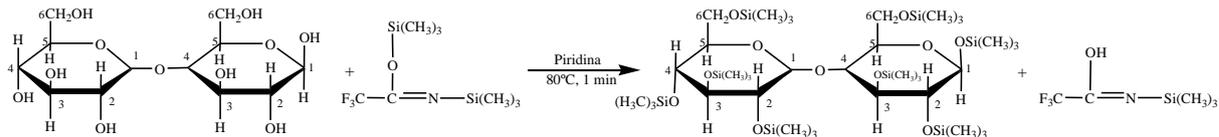


Figura 44 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 65,86 minutos para a maltose acetilada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

Uma breve análise do cromatograma, permite aferir que o tempo de retenção 65,86 minutos pode indicar que o monossacarídeo que constitui a maltose corresponde à *D*-glucose. Devido a este açúcar ter sido analisado anteriormente pelo método B da técnica GC-MS revelando tempos de retenção na ordem de grandeza $65,94 \pm 0,01$. No entanto, esta afirmação só pode ser confirmada após a análise do espectro de massa. Verificando-se que, pela sua comparação com o espectro da figura 17 corresponde à α -*D*-glucopiranosose. Apresentando o pico mássico de m/z 317 e os fragmentos de m/z 242 e 200 característicos deste monossacarídeo na forma de piranose.

A reacção de sililação da maltose consistiu na adição de BSTFA-TMCS a uma solução em piridina, previamente dissolvida no microondas, e submetida a irradiação por microondas a 80°C durante 1 minuto. Deste modo, o esquema 15 ilustra a reacção de sililação da maltose com um rendimento de 58%.



Esquema 15 – Reacção de sililação da maltose com BSTFA-TMCS.

Este dissacarídeo é constituído por duas unidades de *D*-glucose unidas por uma ligação glicosídica $\alpha(1\rightarrow4)$, sendo os hidrogénios dos grupos hidroxilo substituídos pelos grupos TMS.

As figuras 45 e 46 mostram o cromatograma e o respectivo espectro de massa obtido pelo método B da técnica GC-MS.

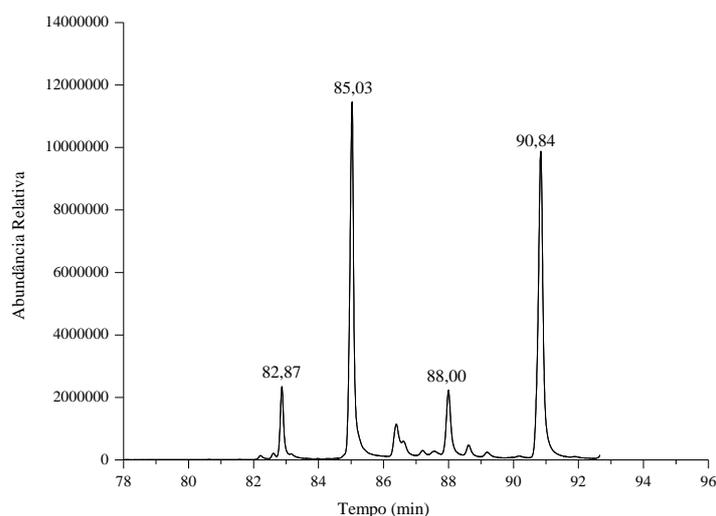


Figura 45 – Cromatograma da maltose siliada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

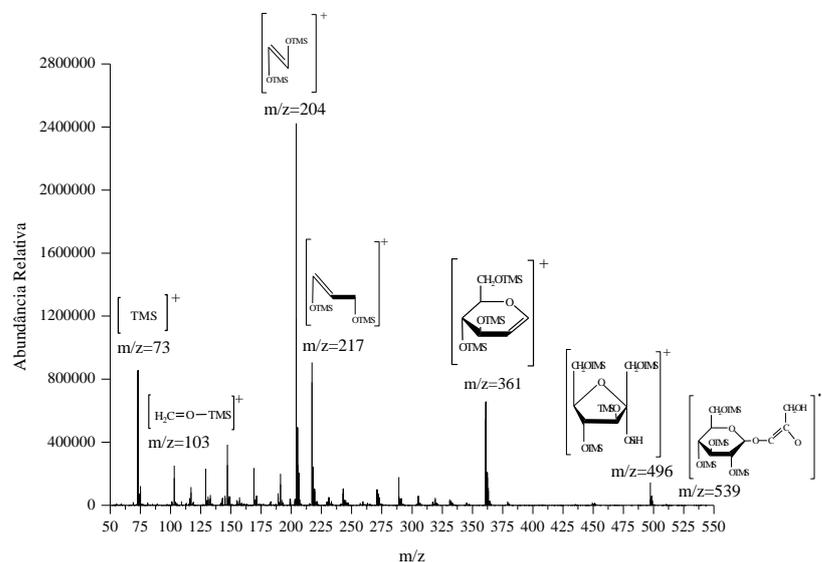


Figura 46 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 85,03 minutos para a maltose siliada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

De acordo com a bibliografia consultada e seguindo a mesma linha de acção de comparação do espectro de massa obtido com a glucose siliada, verifica-se que os

fragmentos de m/z 204 e 217 correspondem à forma de piranose. Todavia, o pico com valor m/z 361 é considerado o íão chave para identificação da *D*-glucopiranosose, tal como foi identificado na figura 20. O fragmento iónico de m/z 496 revela a *D*-frutofuranose, como identificado anteriormente (figura 30) indicando que a *D*-glucose passou à forma de anel pentagonal. O pico mássico 539 anuncia a *D*-glucopiranosose completamente sililada e parte do segundo monossacarídeo ligado por uma ligação glicosídica, como é possível visualizar na estrutura química apresentada na figura 46.

Na metodologia de derivatização estabelecida para a detecção e identificação de monossacarídeos e dissacarídeos por GC-MS, verifica-se que as reacções de acetilação com anidrido acético apresentam rendimentos superiores em relação às reacções de sililação. No entanto, as reacções de sililação revelaram serem mais eficientes nos dissacarídeos, e posteriormente na sua aplicação com os antibióticos aminoglicosídeos.

2.2. Metodologia assistida por microondas: antibióticos aminoglicosídeos

Depois de ter sido desenvolvida uma metodologia para análise de monossacarídeos e dissacarídeos. Em vez de se adoptar pela extensão metodológica em mais compostos do mesmo tipo, decidiu-se testa-la na aplicação a compostos constituídos por açúcares mais complexos e de maior massa. Esta foi aplicada à neomicina e netilmicina. Optando-se pelas reacções de sililação sujeita ao método B da técnica hifenada de GC-MS, devido às vantagens anteriormente apresentadas.

Neomicina

Numa primeira fase para dissolução da neomicina considerou-se o procedimento descrito por Bart Giessen⁵², a amostra foi centrifugada com clorofórmio, adicionando-se posteriormente *n*-heptano e água destilada. Como não se obteve produto, o mesmo procedimento foi repetido modificando os solventes de dissolução, etanol e DMF. Por fim, ainda se tentou os solventes acetoneitrilo, metanol, e água destilada, todavia a solubilização não foi eficaz.

Então a neomicina foi dissolvida em piridina no microondas a uma temperatura de 80°C com ciclos de 10 minutos, sendo posteriormente realizada a reacção com o derivatizante BSTFA-TMCS.

Este antibiótico apresenta na sua estrutura química, uma hexose aminada, duas piranoses e uma furanose, bem como, seis aminas primárias e sete grupos hidroxilos, os quais podem ser derivatizados simultaneamente. A figura 47 representa a esquematização da neomicina sililada com a indicação das principais fragmentações.

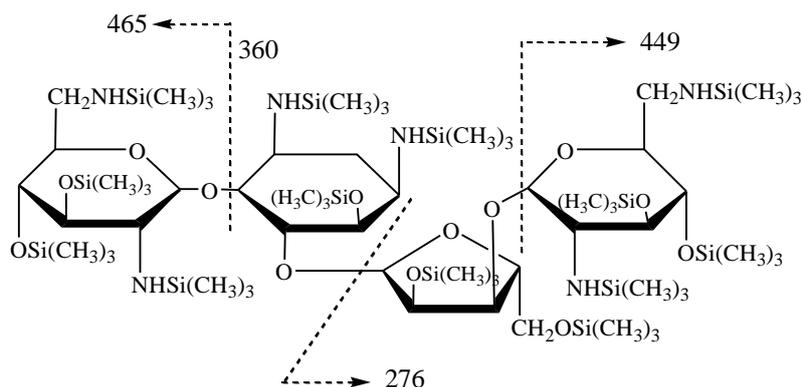


Figura 47 – Estrutura molecular da neomicina sililada com as principais fragmentações.

A figura 48 e 49 ilustram o cromatograma e o espectro de massa obtido para o método B da técnica GC-MS.

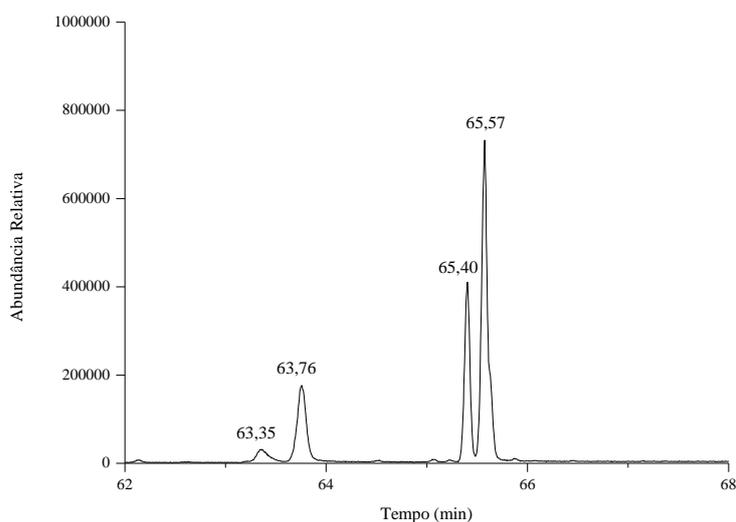


Figura 48 – Cromatograma da neomicina sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

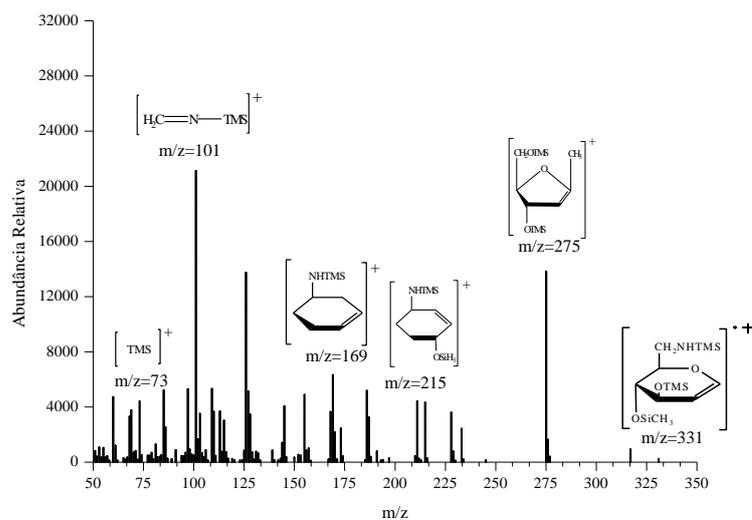


Figura 49 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 65,57 minutos para a neomicina sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

Pelos resultados, constata-se que o ião molecular da neomicina totalmente sililada se encontra ausente devido ao seu elevado peso molecular [$M^+ = 1550$], estando fora da gama do espectrómetro de massa utilizado, intervalos entre m/z 50 a 550. O pico mássico com maior valor de m/z é 331, indicando que uma amina primária e dois grupos hidroxilos se encontram derivatizados na forma piranose. O fragmento iónico de m/z 275 com uma intensidade relativa resulta do anel furanose com os dois grupos hidroxilo sililados, o qual foi identificado no espectro da *D*-frutofuranose sililada (figura 30). A derivatização de uma amina primária da hexose aminada indica a presença do fragmento iónico de m/z 215 e 169. Como seria de esperar nas reacções de sililação, os picos com valores de m/z 101 e 73 encontram-se presentes no espectro de massa.

Netilmicina extraída do injectável

A formulação farmacêutica mais comum da netilmicina é na forma de injectável, pelo que, de modo a proceder à derivatização esta foi extraída por SPE. Tendo como finalidade, a remoção de sais e outros interferentes presentes na amostra.

Este antibiótico é insolúvel em líquidos imiscíveis com água, devido ao seu comportamento hidrofílico, assim, a extracção clássica líquido-líquido com solventes

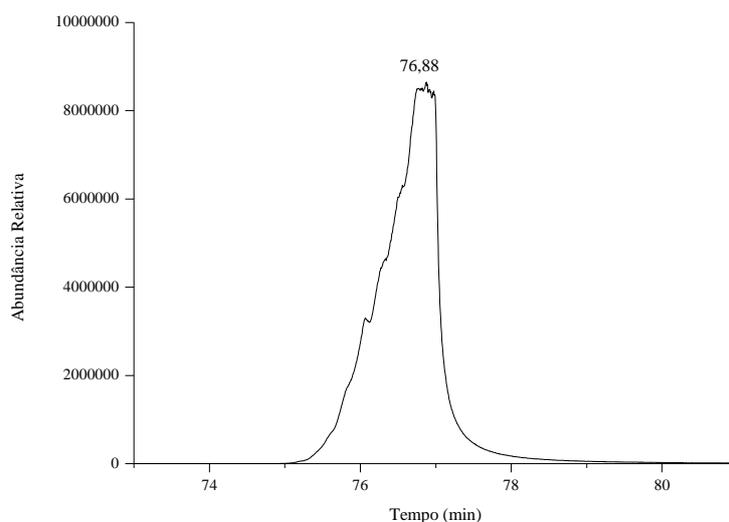


Figura 51 – Cromatograma da netilmicina extraída sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

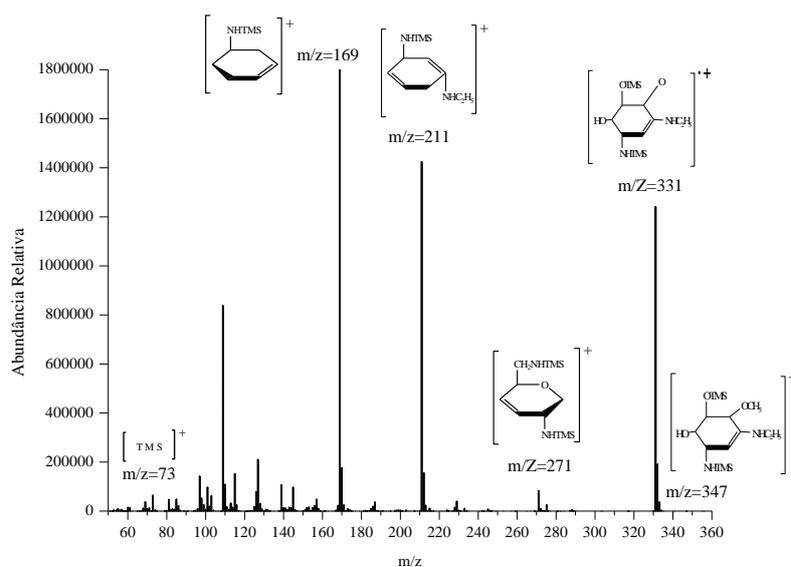


Figura 52 – Espectro de massa correspondente ao tempo de retenção 76,88 minutos para a netilmicina extraída sililada analisada pelo método B da técnica GC-MS.

Relativamente ao espectro de massa da netilmicina, os fragmentos de m/z 347 e 331 revelam que a hexose aminada tem um grupo hidroxilo e uma amina primária derivatizada com grupos trimetilsilil, como se pode verificar pelas estruturas representadas na figura 52. O pico com fraca intensidade de m/z 271 aponta para o anel que apresenta a forma de piranose com as duas aminas primárias derivatizadas. É de salientar ainda, que os picos com os valores de m/z 211 e 169 mostram a hexose com

um grupo amina derivatizado, tal como tinha sido identificado anteriormente no espectro da neomicina (figura 49).

Tendo em consideração trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de investigação de orgânica na identificação e quantificação das principais impurezas da netilmicina. Foi realizado um estudo de degradação forçada para a netilmicina em uma solução de água destilada e numa solução de tampão fosfato, tendo em conta o efeito da temperatura e a exposição à luz solar. Variando o tempo de recolha das amostras, a fim de se poder identificar diferentes impurezas e os seus principais produtos de degradação.

As amostras foram colocadas directamente à exposição solar e em ambiente fechado, a temperaturas de 3°C, 25°C e 50°C. De seguida, realizaram-se três recolhas, após 1, 5 e 9 dias. Verificando-se, que à medida que o tempo passava as amostras ostentavam sinais de degradação física, apresentando uma cor amarelada cada vez mais escura.

Para proceder à análise das amostras, usou-se a técnica cromatográfica LC-MS-MS com ionização por electrospray a operar no modo positivo usando o modo SIM. Tendo-se conhecimento que esta técnica tinha-se revelado apropriada para a identificação de impurezas da netilmicina, as amostras foram dissolvidas em uma solução de 0,4% TFA:MeOH (80:20).

Todavia, a amostra que se encontrava numa solução de tampão fosfato a uma temperatura de 50°C em ambiente fechado após ter decorrido 9 dias, foi a que revelou sinais de degradação mais evidentes, como ilustra a figura 53.

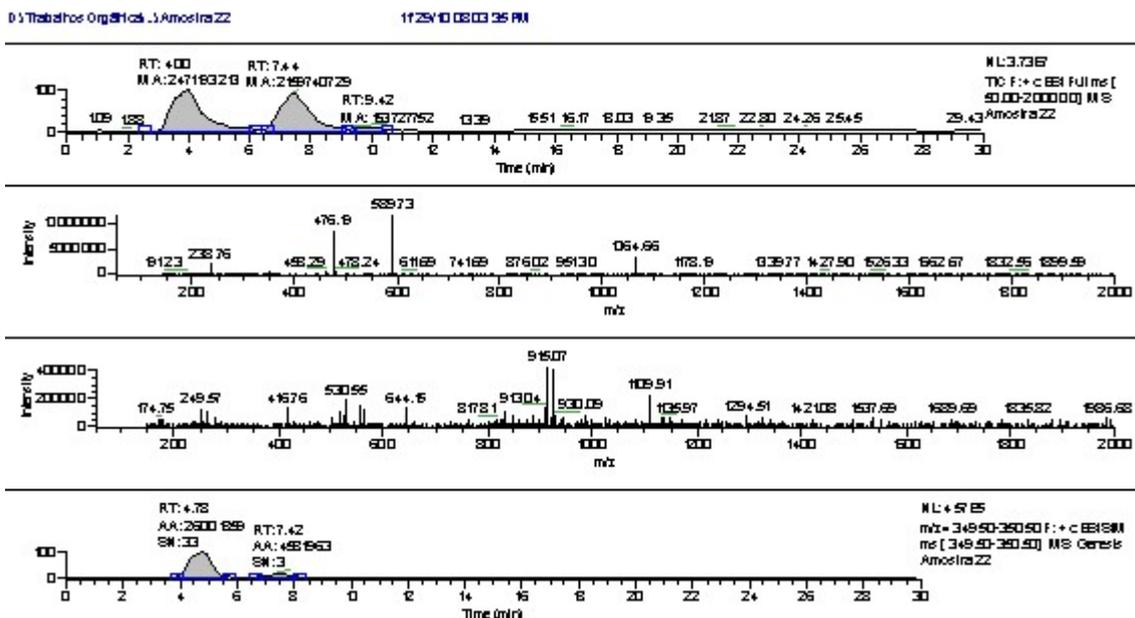


Figura 53 – Amostra de netilmicina em solução de tampão fosfato a uma temperatura de 50°C após 9 dias analisada por LC-MS-MS.

Os cromatogramas da figura anterior indicam a presença da netilmicina e da sua principal impureza 1-*N*-etil-garamina, com os tempos de retenção 7,44 e 4,78 minutos, respectivamente. O primeiro espectro de massa mostra a netilmicina com um valor de m/z 476, o segundo espectro indica-nos possíveis produtos degradados, no entanto não foi possível fazer a sua identificação.

Posteriormente, realizou-se um estudo de degradação forçada ao injectável de netilmicina, comprovando-se a existência de produtos de degradação, quando este foi submetido a condições elevadas de temperatura, 50°C durante 47 dias. Notando-se que à medida que o tempo decorria, o injectável apresentava uma cor cada vez mais escura, evidenciando sinais de degradação.

Ao fim dos 47 dias, a netilmicina foi extraída por SPE, utilizando a metodologia previamente definida. De seguida, efectuou-se a reacção de sililação com o agente derivatizante BSTFA-TMCS, a qual foi analisada pelo método B da técnica GC-MS.

No cromatograma da amostra da netilmicina após a degradação e sililação não se observou nenhum pico. Nem o da netilmicina (tempo de retenção 77,88 minutos), nem qualquer composto novo que pode-se ser produto de degradação. De modo a interpretar melhor os resultados, procedeu-se à análise de netilmicina sililada por injeção directa no LC-MS-MS. Na figura 54 mostra o espectro da netilmicina sililada.

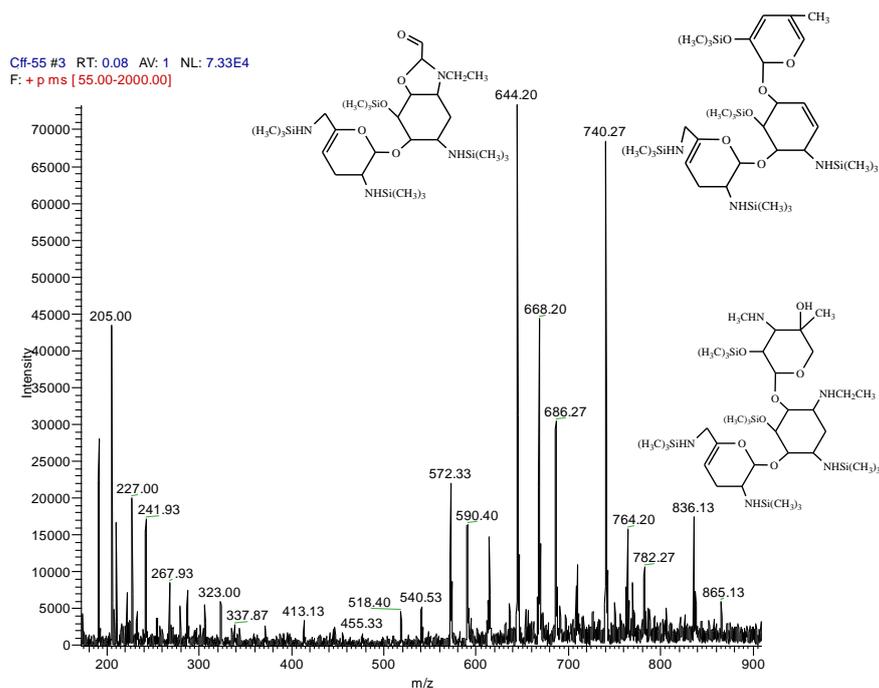


Figura 54 – Espectro de massa da netilmicina extraída sililada analisada pela técnica LC-MS-MS.

Os picos em m/z 836 e 764, correspondem à netilmicina com menos um e dois grupos silil respectivamente. A atribuição dos picos com m/z 740 e m/z 644 pode corresponder com as estruturas apresentadas na figura 54.

Utilizando esta informação como base, realizou-se o espectro com a técnica LC-MS-MS por ionização electrospray a operar em modo positivo usando o modo SIM, da amostra de injectável de netilmicina submetida a degradação (figura 55).

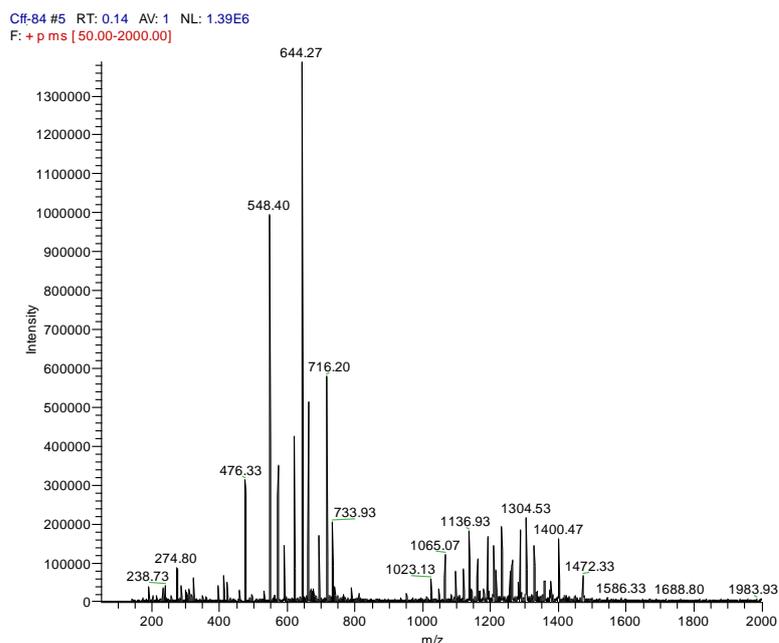


Figura 55 – Espectro de massa da netilmicina extraída sililada após 47 dias de degradação pela técnica LC-MS-MS.

No espectro observa-se a presença de netilmicina sem sililar ($m/z = 476$); o pico em m/z 644 poderia ser da netilmicina sililada, mas não se encontra nenhum outro dos picos característicos deste composto. Ainda o aparecimento de picos mássicos centrados em valores que correspondem a aproximadamente ao dobro do valor dos picos mássicos do composto original, pode indicar a ocorrência da reacções de dimerização ou condensação a partir da molécula inicial, dando lugar a moléculas de maior massa molecular.

Assim, a análise realizada por GC-MS mostrou-se infrutífera, por dois motivos: a sililação não foi completa, e os produtos de degradação mesmo que sililados são demasiado pesados para este tipo de análise.

Procedeu-se a derivatização de netilmicina e do injectável submetido à degradação forçada através da reacção de acetilação. Na figura 56 mostra-se o espectro da netilmicina degradada e acetilada.

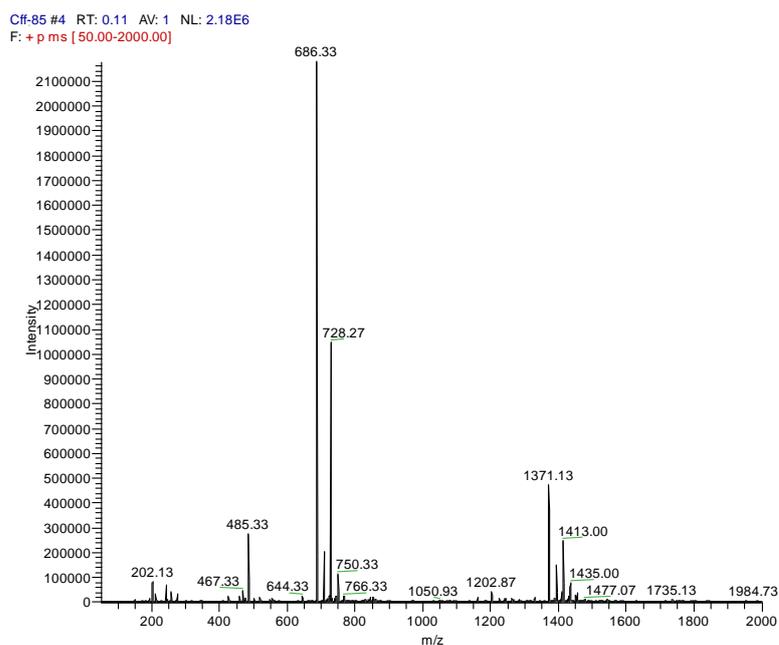


Figura 56 – Espectro de massa da netilmicina extraída acetilada após 47 dias de degradação sujeita à técnica LC-MS-MS.

Pode-se observar que não há netilmicina sem acetilar ($m/z = 476$) e portanto a reacção de derivatização é mais completa que a de sililação, mas tal como na reacção de sililação, não se observa os picos mássicos da netilmicina completamente derivatizada (corresponderia a $m/z = 937, 885, 686$) e os produtos de degradação que correspondem a massas de aproximadamente o dobro do valor do composto original.

Estes resultados corroboram a conclusão obtida com as reacções de sililação. Sendo que os antibióticos aminoglicosídeos originam produtos de degradação maiores que o composto original. O GC-MS não será a técnica mais indicada para estudos de degradação. Ainda que não seja de descartar a possibilidade de ser usada para identificação dos componentes dos compostos aminoglicosídeos.

Capítulo 3 – Experimental

3.1. Instrumentação

Derivatização acelerada por microondas

As reacções de derivatização foram realizadas recorrendo ao equipamento Discover S-Class da CEM com um software para aquisição de dados. Foram estabelecidas condições de controlo e monitorização do equipamento, nomeadamente: temperatura e tempo de reacção a 80°C e um minuto respectivamente, com uma potência máxima de 100 watts.

Extracção em fase sólida

A metodologia SPE foi realizada num sistema de vácuo Thermo Hypersil Keystone. Para o isolamento dos analitos por SPE realizou-se o procedimento descrito na secção 1.3.6. utilizando-se as condições de optimização da extracção descritas por Alexandra Gonçalves²⁵. Brevemente, os cartuxos usados foram Bond Elut Certify

(adsorvente apolar C8 e fase de troca iónica SCX) de 130 mg 3 ml, da marca Varian. Para o condicionamento da coluna usaram-se 3 ml de água destilada e 3 ml de metanol, utilizando-se os mesmos solventes para a lavagem da coluna mas com um volume de 5 ml. Como solvente de eluição foi utilizado uma solução de amónia:metanol (30:70) com um pH de 10.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear protónica

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos num espectrómetro Bruker-AMX de 400 MHz, usando-se como solventes o clorofórmio deuterado (CDCl_3) e o metanol deuterado (CD_3OD). Os valores dos desvios químicos (δ) apresentados são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

Placa de aquecimento

A degradação da netilmicina foi efectuada numa placa de aquecimento com agitação magnética Heidolph MR-3001.

Cromatografia em camada fina

As análises cromatográficas em camada fina foram efectuadas em placas de sílica com uma espessura de 0,20 mm, da marca Merck. A detecção dos compostos foi efectuada por irradiação de luz ultra-violeta a 254 nm.

Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa

Método A

Com o equipamento GC-MSD HP 7820A/5975 registaram-se os espectros de GC-MS, com ionização por impacto electrónico (70 eV) e com aquisição de dados no modo de varrimento com um intervalo de massa entre m/z 50 e 550. A amostra foi injectada no modo Split a uma temperatura de 220°C. Os analitos foram separados por uma coluna capilar HP-1MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). A coluna foi mantida a uma temperatura de 280°C durante 30 minutos e o tempo total de execução foi de 40

minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio. A temperatura da interface e da fonte iónica foram 200°C e 250°C respectivamente.

Método B

Os espectros de GC-MS foram registados usando o equipamento GC-MSD HP 7820A/5975, com ionização por impacto electrónico (70 eV) e com aquisição de dados no modo de varrimento, no intervalo de massa m/z 50 e 550. A injeção da amostra foi efectuada no modo Split a uma temperatura de 270°C. Os analitos foram separados por uma coluna capilar HP-1MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). A coluna foi mantida a 180°C durante 2 minutos, aquecida até 250°C com um incremento de 6°C/minuto, sendo mantida a esta temperatura durante 20 minutos. Com um tempo de corrida aproximadamente de 90 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio. A temperatura da interface e da fonte iónica foram 200°C e 250°C, respectivamente.

Cromatografia líquida com detecção de espectrometria de massa em tandem

Os espectros de LC-MS-MS foram efectuados num sistema LC Surveyor (ThermoFinnigan, USA) equipado com uma bomba, um sistema de injeção automático e um forno de colunas. A separação foi efectuada usando uma coluna XTerra MS C18 (250 x 2,1 mm, 5 μ m). A coluna foi mantida a 25°C e a fase móvel utilizada foi (A) – 0,4% TFA:MeOH (80:20), (B) – MeOH e (C) – 0,4% TFA com um pH de 2,4. A eluição foi efectuada com o seguinte gradiente: 20 minutos a 0% de A para 30% de A, 20-21 minutos a 30% de A para 0% de A, 21-30 minutos a 0% de A, mantendo constante a 1% a fase móvel B. O fluxo foi de 200 μ L/minuto, o volume de injeção foi de 10 μ L e o tempo total de executado foi de 30 minutos²⁵.

A análise de espectrometria de massa foi realizada utilizando o equipamento Finnigan LCQ, com um analisador de massa ion trap (ThermoFinnigan, San Jose, CA) e uma fonte de ionização electrospray a operar em modo positivo. O nitrogénio foi utilizado como gás de arraste e em ion trap foi usado como gás de colisão o hélio. Os dados foram adquiridos com um software ThermoFinnigan Xcalibur 1.2.

3.2. Amostras, solventes e reagentes

Para a execução dos ensaios experimentais foram empregues as seguintes amostras: D(+)-glucose monohidratada (Merck, $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$), D(+)-galactose (Merck, $C_6H_{12}O_6$), D(-)-frutose (Baker, $C_6H_{12}O_6$), D(+)-ribose (Merck, $C_5H_{10}O_5$), sacarose (Himedia, 99,5%, $C_{12}H_{22}O_{11}$), D(+)-lactose monohidratada (Himedia, $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$), D(+)-maltose (Merck, $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$), sulfato de neomicina (Cipan, $C_{24}H_{48}N_6O_{12}$), sulfato de netilmicina (Cipan, $C_{21}H_{41}N_5O_7$), injectável de netilmicina (Mediquímica Portugal).

Utilizaram-se os seguintes solventes: Acetonitrilo (Panreac, *HPLC Grade* 99,9%), Ácido Trifluoroacético (Sigma-Aldrich, 99%), Amónia (Absolve, 25%), Clorofórmio (Panreac), Cetona (Absolve), Dioxano (Panreac, 99,5%), Metanol (Merck, *HPLC Grade* 99,5%), N,N-Dimetilformamida (Riedel-de Háën, *HPLC Grade* 99,9%), N-heptano (Panreac), Piridina (Panreac, 99,5%). Diclorometano seco por refluxo com cloreto de cálcio durante três horas, seguido de destilação à pressão atmosférica.

Todos os reagentes adquiridos comercialmente eram químicos de pureza elevada e foram utilizados sem qualquer purificação adicional. Anidrido Acético (Panreac, 99%), Anidrido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, 99%), N-O-Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano (Sigma-Aldrich, 99%), Ácido Clorídrico (Absolve, 34-37%), Bicarbonato de sódio (Farma-Química, 99%).

3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Metodologia assistida por microondas – Reacções de acetilação

3.3.1.1. Monossacarídeos

A piridina (1 ml) e o anidrido acético (2 ml) foram adicionados à glucose (200 mg, 1,11 mmol) num tubo de microondas. A solução foi introduzida no vaso reaccional do microondas aquecida durante 1 minuto a 80°C com uma potência máxima de 100 watts. Após o arrefecimento, a amostra foi submetida a uma atmosfera de azoto, para evaporação da piridina e do anidrido acético. O produto da reacção foi dissolvido com diclorometano (5 ml) e lavado com uma solução de ácido clorídrico 0,1 M (2 ml). A fase orgânica foi recolhida, adicionou-se mais 5 ml de diclorometano e lavou-se com

água destilada (2 ml), uma solução saturada de bicarbonato de sódio (2 x 2 ml) e finalmente água destilada (3 x 2 ml). Recolheu-se a fase orgânica que foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada a pressão reduzida, resultando um composto oleoso com aspecto esbranquiçado. Os produtos da reacção foram identificados utilizando a cromatografia em camada fina, usando como fase móvel, uma mistura de diclorometano:metanol (90:10).

A metodologia anteriormente descrita foi repetida para os monossacarídeos, frutose (200 mg; 1,11 mmol), galactose (200 mg; 1,11 mmol) e ribose (200 mg; 1,33 mmol).

A caracterização da glucose e da glucose acetilada por RMN ^1H encontram-se a baixo descritas:

Glucose – RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 5,15(d, 1H, J = 3,6 Hz, H_1); 4,56 (d, 1H, J = 7,6 Hz, H_5); 3,84-3,61 (m, 5H); 3,47-3,31 (m, 4H); 3,17 (t, 1H, J = 8,7 Hz).

Glucose acetilada – RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6,33 (d, 1H, J = 3,6 Hz, H_1); 5,71 (d, 1H, J = 8 Hz, H_5); 5,45 (t, 1H, J = 10 Hz); 5,25 (t, 1H, J = 9,20 Hz); 5,17-5,09 (m, 3H); 4,26 (t, 1H, J = 4 Hz); 4,13-4,09 (m, 2H); 3,86-3,83 (m, 1H); 2,18 (s, 3H); 2,09 (s, 6H); 2,03 (d, 9H, J = 2 Hz).

3.3.1.2. Dissacarídeos

Maltose (250 mg, 0,73 mmol) em piridina (5 ml) foi colocada no microondas a uma temperatura de 80°C durante 30 minutos. Da solução anterior foi retirado 1 ml (50 mg, 0,15 mmol de maltose), adicionando-se anidrido acético (2 ml). A mistura reaccional foi colocada no microondas e aquecida a uma temperatura de 80°C durante 1 minuto. A pós o seu arrefecimento, amostra foi submetida a uma atmosfera de azoto. O produto da reacção foi dissolvido com diclorometano (5 ml) e lavado com uma solução de ácido clorídrico 0,1 M (2 ml). A fase orgânica foi recolhida, adicionou-se mais diclorometano (5 ml) e lavou-se com água destilada (2 ml), uma solução saturada de bicarbonato de sódio (2 x 2 ml) e por fim com água destilada (3 x 2 ml). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se os voláteis a pressão reduzida. Obtendo-se um composto oleoso esbranquiçado. Efectuou-se a TLC usando como fase móvel uma mistura de diclorometano:metanol (90:10).

A metodologia descrita anteriormente foi aplicada aos dissacarídeos lactose (50 mg; 0,15 mmol) e sacarose (250 mg; 0,73 mmol) com um tempo de dissolução das amostras de 50 minutos. No entanto, em relação à sacarose a reacção de acetilação foi realizada com o derivatizante anidrido trifluoroacético.

3.3.2. Metodologia assistida por microondas – Reacções de silação

3.3.2.1. Monossacarídeos

Num tubo de microondas colocou-se glucose (50 mg, 0,28 mmol), adicionando-se piridina (1 ml) e N-O-Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano (BSTFA-TMCS) (400 µL). A reacção foi colocada no vaso reaccional do microondas a 80°C durante 1 minuto com uma potência máxima de 100 watts. Após a evaporação da mistura reaccional, adicionou-se diclorometano (5 ml) e uma solução de ácido clorídrico 0,1 M (2 ml). Recolheu-se a fase orgânica que foi lavada sucessivamente conforme se descreve: água destilada (2 ml), uma solução saturada de bicarbonato de sódio (2 x 2 ml) e água destilada (3 x 2 ml). A fase orgânica é seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. O composto obtido é oleoso transparente. A técnica de TLC permitiu a identificação do composto com uma fase móvel diclorometano:metanol (90:10).

A metodologia anterior foi realizada para a galactose (50 mg; 0,28 mmol) e frutose (50 mg; 0,28 mmol).

3.3.2.2. Dissacarídeos

Maltose (250 mg, 0,73 mmol) em piridina (5 ml) foi dissolvida no microondas durante 30 minutos a uma temperatura de 80°C. Dessa solução foi retirado 1 ml (50 mg, 0,15 mmol de maltose) ao qual foi adicionado BSTFA-TMCS (400 µL) e colocada no vaso reaccional do microondas durante 1 minuto a uma temperatura de 80°C com uma potência máxima de 100 watts. Após o arrefecimento da reacção, foi evaporada com uma atmosfera de azoto. O produto da reacção foi dissolvido com diclorometano (5 ml) e lavado com uma solução de ácido clorídrico 0,1 M (2 ml). A fase orgânica foi recolhida, adicionou-se mais diclorometano (5 ml) e lavou-se com água destilada (2 ml), uma solução saturada de bicarbonato de sódio (2 x 2 ml) e por fim com água destilada

(3 x 2 ml). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se os voláteis a pressão reduzida. Obtendo-se um composto oleoso transparente. Efectuou-se a TLC usando como fase móvel uma mistura de diclorometano:metanol (90:10).

A metodologia acima descrita foi executada para os dissacarídeos lactose (50 mg; 0,15 mmol) e sacarose (250 mg; 0,73 mmol), em que cada amostra foi dissolvida durante 50 minutos.

3.3.2.3. Neomicina

Sulfato de neomicina (5 mg, $8,17 \times 10^{-3}$ mmol) em piridina (100 μ L) foi dissolvido no microondas a uma temperatura de 80°C durante 50 minutos com uma potência máxima de 100 watts. Posteriormente adicionou-se BSTFA-TMCS (20 μ L) e colocou-se no vaso reaccional do microondas durante 1 minuto a 80°C. Após a evaporação da mistura reaccional, adicionou-se diclorometano (5 ml) e uma solução de ácido clorídrico 0,1 M (2 ml). Recolheu-se a fase orgânica que foi lavada sucessivamente conforme se descreve: água destilada (2 ml), uma solução saturada de bicarbonato de sódio (2 x 2 ml) e água destilada (3 x 2 ml). A fase orgânica resultante é seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada a pressão reduzida, obtendo-se um composto sólido branco. O produto da reacção foi identificado utilizando a cromatografia em camada fina, usando como fase móvel uma mistura de diclorometano:metanol (90:10).

3.3.2.4. Injectável de netilmicina

O injectável de netilmicina (150 mg/1,5 ml) foi dissolvido em água destilada (25 ml). Retirou-se 1 ml ao qual foram extraídos os seus analitos por SPE. As condições de optimização da extracção encontram-se descritas na secção Instrumentação. Após a separação do analito, a solução foi evaporada com uma atmosfera de azoto. Num tubo de microondas colocou-se a netilmicina extraída (1,1 mg, $2,32 \times 10^{-3}$ mmol) adicionando-se piridina (1ml) e BSTFA-TMCS (10 μ L). A mistura reaccional foi colocada no microondas a uma temperatura de 80°C durante 1 minuto. Após o arrefecimento da reacção, foi evaporada com um fluxo de azoto, resultando um composto de cor amarelada. Fez-se a TLC usando como fase móvel uma mistura de diclorometano:metanol (90:10).

3.3.3. Estudos de degradação forçada em netilmicina

Preparou-se uma solução de netilmicina (200 mg, 0,42 mmol) em água destilada (20 ml) e uma solução de netilmicina (200 mg, 0,42 mmol) em uma solução de tampão fosfato (20 ml) com um pH de 7,15. De cada solução retirou-se 3 ml, que se analisaram de acordo com dois factores de estabilidade, previamente definidos, temperatura (3°C, 25°C e 50°C) e exposição à luz solar. Para uma temperatura de 3°C e sem exposição solar, as amostras foram colocadas num frigorífico, controlando a sua temperatura com o uso de um termómetro. A 25°C, realizaram-se dois ensaios para cada amostra, um ficou exposto directamente à luz do dia, enquanto o outro ensaio foi envolto em papel de alumínio. Para 50°C, as amostras foram envolvidas em papel de alumínio e colocadas num banho de parafina, o qual foi monitorizado pelo uso de um termómetro. De cada amostra (4 amostras de netilmicina/água e 4 amostras de netilmicina/tampão fosfato) retiraram-se 500 µL após 1 dia. As soluções foram sujeitas a uma atmosfera de azoto, para evaporação do solvente. Esta metodologia foi repetida, variando o tempo de recolha das amostras. A segunda recolha foi realizada 5 dias depois, e a terceira recolha passados 9 dias.

Um injectável de netilmicina foi colocado na estufa a uma temperatura de 50°C durante 47 dias, posteriormente foi submetido à metodologia descrita para o injectável de netilmicina.

Capítulo 4 – Conclusão

O desenvolvimento de uma metodologia de derivatização assistida por microondas que permita a detecção e a identificação de monossacarídeos, dissacarídeos e posteriormente antibióticos aminoglicosídeos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, é uma mais valia para a indústria, tanto a nível alimentar, farmacêutico como em amostras biológicas.

Estes compostos são constituídos por um número elevado de grupos hidroxilos, não apresentando grupos cromóforos, o que limita a sua capacidade de análise por métodos cromatográficos, sendo necessária a sua derivatização. As reacções de acetilação com o derivatizante anidrido acético apresentam taxas de rendimentos superiores às reacções de sililação. No entanto, as reacções de sililação com o agente derivatizante BSTFA-TMCS revelaram ser mais eficientes, obtendo-se uma melhor separação cromatográfica dos analitos. As reacções foram realizadas por irradiação de microondas a uma temperatura de 80°C durante um minuto, obtendo-se uma redução significativa do tempo reaccional. A utilização do solvente piridina facilita o ataque

nucleofílico entre a amostra e o agente derivatizante inibindo a formação de produtos secundários.

Desenvolveram-se dois métodos A e B para a técnica GC-MS, todavia o método B revelou ser mais indicado na detecção e identificação dos dissacarídeos e dos aminoglicosídeos, devido à rampa de temperatura criada, separando as amostras consoante a sua volatilidade.

A metodologia desenvolvida permite detectar tempos de retenção específicos consoante o monossacarídeo em estudo e identificar fragmentos iónicos característicos. Os monossacarídeos utilizados para a realização deste estudo foram a glucose, galactose, frutose e ribose.

Posteriormente esta metodologia foi alargada aos dissacarídeos (sacarose, lactose e maltose) e antibióticos aminoglicosídeos (neomicina e netilmicina), identificando as unidades que constituem estes componentes. Utilizando-se a extracção SPE para isolar a netilmicina do injectável.

De forma a complementar o trabalho desenvolvido realizou-se um estudo de degradação forçada para o injectável de netilmicina, sendo depois derivatizado e analisado por GC-MS. Verificando-se que a técnica GC-MS não será a mais indicada para estudos de degradação destes compostos. Devido aos antibióticos aminoglicosídeos originarem produtos de degradação maiores que o composto original, implicando uma massa demasiado elevada para este tipo de análise, e também por a reacções de derivatização não se terem revelado completas. No entanto, não é de descartar a utilização desta técnica, visto que é possível a identificação dos componentes que fazem parte da estrutura química dos compostos aminoglicosídeos.

Poderá ser interessante para desenvolvimento futuro deste estudo, a utilização da metodologia desenvolvida em matrizes alimentares e biológicas, permitindo a identificação e caracterização de glúcidos de uma forma mais rápida e eficaz.

Capítulo 5 – Bibliografia

1. Donald Voet, J.G.V. Bioquímica. *Artmed*, 3ª Edição 356-362(2006).
2. Medeiros, P.M. & Simoneit, B.R.T. Analysis of Sugars in Environmental Samples by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of chromatography. A* **1141**, 271-278(2007).
3. Wahjudi, P.N. et al. Measurement of Glucose and Fructose in Clinical Samples Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Clinical Biochemistry* **43**, 198-207(2010).
4. Xue, R. et al. Simultaneous Determination of Blood Glucose and Isoleucine Levels in Rats After Chronic Alcohol Exposure by Microwave-Assisted Derivatization and Isotope Dilution Gas Chromatography / Mass Spectrometry. *Animal Research* 245-252(2008).
5. Ruiz-Matute, A.I., Sanz, M.L. & Martinez-Castro, I. Use of Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Identification of a New Disaccharide in Honey. *Journal of Chromatography. A* **1157**, 480-3(2007).
6. Di Gioia, M. Quantitative Analysis of Human Salivary Glucose by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B* **801**, 355-358(2004).

7. Haux, J. Digitoxin is a Potential Anticancer Agent for Several Types of Cancer. *Medical Hypotheses* **53**, 543-8(1999).
8. Robert C. Arkins; Francis A. Carey. Organic Chemistry: A Brief Course. *MCGraw-Hil Company 2ª Edition*, 401-424(1998).
9. R. Morrison, R.B. Química Orgânica. *Fundação Calouste Gulbenkian 13ª Edição*, 1118-1177(1996).
10. Stead, D.A. Current Methodologies for the Analysis of Aminoglycosides. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* **747**, 69-93(2000).
11. Ferrier, R. Monosaccharides. *Encyclopedia of Life Sciences* 1-12(2001).
12. João Carlos de Sousa Manual de Antibióticos Antibacterianos. *Universidade de Fernando Pessoa* 323-399(2006).
13. Serafim Guimarães, Daniel Moura, P.S. da S. Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas. Manual de Farmacologia e Farmacoterapia. *Porto Editora, 5ª Edição* 863-871(2006).
14. Oertel, R., Neumeister, V. & Kirch, W. Hydrophilic Interaction Chromatography Combined with Tandem-Mass Spectrometry to Determine Six Aminoglycosides in Serum. *Journal of Chromatography A* **1058**, 197-201(2004).
15. Zembower, T.R. et al. The Utility of Aminoglycosides in An Era of Emerging Drug Resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* **10**, 95-105(1998).
16. Huidobro, a L., García, A. & Barbas, C. Rapid Analytical Procedure for Neomycin Determination in Ointments by CE with Direct UV Detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **49**, 1303-7(2009).
17. Hanko, V.P. & Rohrer, J.S. Suitability of a Liquid Chromatography Assay of Neomycin Sulfate to Replace the Microbiological Assay for Neomycin in USP Monographs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **51**, 96-102(2010).
18. Adams, E. et al. Determination of Netilmicin Sulfate by Liquid Chromatography with Pulsed Electrochemical Detection. *Journal of Chromatography. A* **812**, 151-7(1998).
19. Li, B. et al. Characterization of Impurities in Sisomicin and Netilmicin by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 3455-3471(2008).

20. Qiu, W. et al. GC–MS Determination of Sucralose in Splenda. *Chromatographia* **66**, 935-939(2007).
21. Clarence D. Chang. Synthesis of a Silicone Derivative of Sucrose. *Makromol. Chemistry* **773**(1957).
22. Larson, P.A. Gas Chromatographic Separation of Lactose and Sucrose as the Trimethylsilyl Derivatives. *Journal of Chromatography* **345-349**(1974).
23. Serrano, J.M. & Silva, M. Rapid and Sensitive Determination of Aminoglycoside Antibiotics in Water Samples Using a Strong Cation-Exchange Chromatography Non-Derivatisation Method with Chemiluminescence Detection. *Journal of chromatography. A* **1117**, 176-83(2006).
24. James W. Mayhew, S.L.G. Gas-Liquid Chromatographic Method for the Assay of Aminoglycoside Antibiotics in Serum. *Journal of Chromatography A* **151**, 133-146(1978).
25. Maria Alexandra de Castro Albuquerque Rocha Gonçalves. Tese de Doutoramento, “Desenvolvimento de Controlo de Qualidade e Validação de Princípios Activos em Fármacos por Métodos Físico-Químicos.” *Instituto Superior Técnico de Lisboa* (2011).
26. Isoherranen, N. & Soback, S. Chromatographic Methods for Analysis of Aminoglycoside Antibiotics. *Journal of AOAC International* **82**, 1017-45(1999).
27. Júlio Carlos Afonso. Análise Química Quantitativa. Vogel. *Livros Técnicos e Científicos, 6ª Edição* (2002).
28. Skoog; Holler; Nieman. Princípios de Análise Instrumental. *Editora Artmed, 5ª Edição* 598-637(1998).
29. Skoog; West; Holler; Crouch. Fundamentos de Química Analítica. *Editora Thomson, 8ª Edição* 889-945(2000).
30. Sue Jickells; Adam Negrusz. Clarke’s Analytical Forensic Toxicology. *Pharmaceutical Press* **1 3ª Editi**, (2008).
31. Halket, J.M. et al. Chemical Derivatization and Mass Spectral Libraries in Metabolic Profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany* **56**, 219-43(2005).
32. Words, K. Guide to Derivatization Reagents for GC. *Supelco, Sigma-Aldrich* 1-12(1997).

33. Söderholm, S.L., Damm, M. & Kappe, C.O. Microwave-Assisted Derivatization Procedures for Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis. *Molecular Diversity* **14**, 869-88(2010).
34. D. R. Knapp. Handbook of Analytical Derivatization Reaction. *John Wiley & Sons, New York* (1979).
35. António Sanseverino. Microondas Em Síntese Orgânica. *Química Nova* **25**, 660-667(2002).
36. Leonelli, C. & Mason, T.J. Microwave and Ultrasonic Processing: Now a Realistic Option for Industry. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **49**, 885-900(2010).
37. Larhed, M. & Hallberg, A. Microwave-Assisted High-Speed Chemistry : A New Technique in Drug Discovery. *Science* **6**, 406-416(2001).
38. Damm, M. et al. Microwave-Assisted High-Throughput Derivatization Techniques Utilizing Silicon Carbide Microtiter Platforms. *Journal of Chromatography. A* **1217**, 167-70(2010).
39. Polettin, A. Ionisation, Ion Separation and Ion Detection in LC-MS: Applications of LC-MS in Toxicology. *A. Ed. Pharmaceutical Press* 2-22(2006).
40. Dean, J.R. Extraction Methods for Environmental Analysis. *John Wiley & Sons, New York* 1-302(1998).
41. United States Pharmacopeia 24. *United States Pharmacopeial Convention Inc.*
42. Ascensão Farinha; Paula Tavares; M^aJoão Sarmiento. Estabilidade de Medicamentos: Conceitos e Metodologias. *Laboratório de Estudos Farmacêuticos* (2001).
43. Fabiano O. Silva. Microwave-Assisted Derivatization of Glucose and Galactose for Gas Chromatographic Determination in Human Plasma. *Clinical Chemistry* **2**, 334-335(2006).
44. Simkovic, I. Primary Reactions of Sucrose Thermal Degradation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **70**, 493-504(2003).
45. Price, N.P.J. Acyclic Sugar Derivatives for GC/MS Analysis of ¹³C-Enrichment During Carbohydrate Metabolism. *Analytical chemistry* **76**, 6566-74(2004).
46. Silva, F.O. & Ferraz, V. Microwave-Assisted Preparation of Sugars and Organic Acids for Simultaneous Determination in Citric Fruits by Gas Chromatography. *Food Chemistry* **88**, 609-612(2004).

47. Quimica, I.D. et al. Identification of the Components of Aldoses in a Tautomeric Equilibrium Mixture as Their Trimethylsilyl Ethers by Capillary Gas Chromatography. *Chromatographia* 43-46(1987).
48. Martínez-Castro; M. I. Páez. Gas Chromatographic Behaviour of Carbohydrate Trimethylsilyl Ethers. Aldohexoses. *Journal of Chromatography* **462**, 49-60(1989).
49. O. S. Chizhov; N. V. Molodtsov. Mass Spectrometry of Trimethylsilyl Ethers of Carbohydrates. *Institute for Chemistry of Natural Products, U.S.S.R. Academy of Sciences Moscow* **4**, 273-276(1967).
50. D'Antona, N. et al. Enzymatic Procedures in the Preparation of Regioprotected D-fructose Derivatives. *Carbohydrate Research* **340**, 319-23(2005).
51. García Raso; Martínez Castro. Gas Chromatographic Retention of Carbohydrate Trimethylsilyl Ethers. Ketohehexoses. *Journal of Chromatography* **471**, 205-216(1989).
52. Bart Giessen; Kiyoshi Tsuji. GLC Assay Method for Neomycin in Petrolatum-Based Ointments. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **60**, 1068-1070(1971).