



Ana Raquel da Cunha Pinho

DESENVOLVIMENTO DE UMA TÉCNICA DE HPLC PARA A QUANTIFICAÇÃO DE COLISTINA EM PLASMA HUMANO E A SUA MONITORIZAÇÃO SÉRICA EM DOENTES INTERNADOS NO CHUC

Dissertação de mestrado na área científica de Farmácia, especialidade Farmacologia Aplicada, orientada pela Senhora Professora Doutora Ana Cristina Bairrada Fortuna e pela Senhora Professora Doutora Marília João Rocha e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Raquel da Cunha Pinho

Desenvolvimento de uma técnica de HPLC para a quantificação de Colistina em plasma humano e a sua monitorização sérica em doentes internados no CHUC

Dissertação de Mestrado em Farmacologia Aplicada, orientada pela Professora Doutora Ana Fortuna e coorientada pela Professora Doutora Marília Rocha e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”

- Theodore Roosevelt

AGRADECIMENTOS

Para que a presente dissertação se tornasse uma realidade, foi necessário o apoio, a compreensão e a colaboração de diversas pessoas, sem as quais, direta ou indiretamente, este projeto não teria sido mais do que isso. Desta forma, gostaria de expressar a minha imensa gratidão a todos aqueles que, de um ou outra forma, contribuíram para que esta dissertação fosse uma concretização possível.

À Prof. Doutora Ana Fortuna, na qualidade de minha orientadora científica, a minha gratidão pela sua disponibilidade, apoio e rigor científico com os quais acompanhou ao longo do desenvolvimento deste trabalho e reviu a presente dissertação.

À Prof. Doutora Marília Rocha, na qualidade de minha coorientadora científica, a minha gratidão pela sua disponibilidade e apoio com os quais, igualmente, acompanhou ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus amigos que, direta ou indiretamente, deram o seu contributo ou auxílio para o desenvolvimento desta dissertação, o meu agradecimento pela paciência, apoio, atenção e força nos momentos mais difíceis, aqueles a quem me dirijo sabê-lo-ão.

Não poderia deixar de dirigir um agradecimento especial à minha família, em particular aos meus pais e irmã, pela dedicação, amor e apoio incondicionais ao longo de todo o percurso académico.

Ao meu namorado pela paciência e compreensão e, em especial, por me dedicar o seu tempo e palavras de encorajamento durante o processo de desenvolvimento desta dissertação, o meu muito obrigado.

Para finalizar, ao Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, E. P. E. pela cedência das amostras clínicas e aos doentes pelo consentimento na cedência das mesmas, a minha gratidão, pois sem estas não teria sido possível concluir a dissertação.

Índice

	Página
1. Objetivos.....	17
2. Colistina.....	18
2.1. Perspetiva histórica.....	18
2.2. Estrutura química.....	19
2.3. Propriedades farmacodinâmicas.....	21
2.3.1. Mecanismo de ação.....	21
2.3.2. Eficácia, espectro de atividade e uso clínico.....	21
2.3.3. Toxicidade e contraindicações.....	22
2.3.4. Desenvolvimento de resistências bacterianas.....	26
2.4. Formulações, vias de administração e dosagens.....	28
2.5. Propriedades farmacocinéticas.....	31
2.5.1. Absorção.....	31
2.5.2. Distribuição.....	32
2.5.3. Eliminação.....	33
2.5.4. Fatores que afetam a farmacocinética da Colistina.....	34
2.6. Interações farmacológicas.....	34
3. Monitorização terapêutica da Colistina.....	35
3.1. Considerações gerais.....	35
3.2. Monitorização da concentração de Colistina.....	36
3.2.1. Relação concentração-efeito.....	36
3.2.2. O que monitorizar e quando?.....	38
3.2.3. Como colher as amostras?.....	38
3.2.4. Como determinar as concentrações séricas de Colistina?.....	38

4. Quantificação da Colistina por HPLC	39
4.1. Considerações gerais sobre HPLC	39
4.2. Condições cromatográficas para quantificar a Colistina	41
4.2.1. Coluna Cromatográfica	46
4.2.2. Fase móvel	46
4.2.3. Detecção	47
4.2.3.1. Detecção por fluorescência	47
4.2.3.2. Detecção por espectrometria de massa	47
4.2.3.3. Detecção por ultravioleta-visível	48
4.2.4. Padrão interno	48
4.3. Técnicas de preparação das amostras	49
4.3.1. Precipitação de proteínas	57
4.3.2. Extração em fase sólida	57
4.3.3. Derivatização (detecção por fluorescência)	58
4.4. Estabilidade e armazenamento	59
5. Materiais e Métodos	60
5.1. Reagentes e compostos	60
5.2. Soluções stock, padrões de calibração e padrões de controlo da qualidade	60
5.3. Preparação e extração das amostras plasmáticas	61
5.4. Sistema HPLC e condições cromatográficas	63
5.5. Validação do método	64
5.5.1. Seletividade	64
5.5.2. Linearidade e limite de quantificação	64
5.5.3. Precisão e exatidão	65
5.5.4. Recuperação	65

5.5.5. Estabilidade em plasma.....	66
5.6. Aplicação do método a amostras clínicas.....	66
6. Resultados.....	68
6.1. Desenvolvimento do método.....	68
6.1.1. Detecção por DAD.....	68
6.1.2. Derivatização para detecção por fluorescência.....	70
6.1.3. Preparação e extração das amostras plasmáticas.....	75
6.1.4. Seleção do padrão interno.....	77
6.2. Validação do método.....	80
6.2.1. Separação cromatográfica e seletividade.....	80
6.2.2. Linearidade e limite de quantificação.....	81
6.2.3. Precisão e exatidão.....	82
6.2.4. Recuperação.....	82
6.2.5. Estabilidade em plasma.....	83
6.3. Aplicação do método a amostras clínicas.....	84
7. Discussão.....	90
7.1. Desenvolvimento do método.....	90
7.2. Validação do método.....	93
7.3. Aplicação do método a amostras clínicas.....	94
8. Conclusões.....	96
9. Bibliografia.....	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura química da Colistina.....	20
FIGURA 2. Esquema da preparação das amostras de plasma humano.....	62
FIGURA 3. Cromatogramas obtidos através da detecção por DAD de soluções diretas de Colistina eluídas com as fases móveis 3 e 4 (a e b, respetivamente) e de amostras plasmáticas, após processo de SPE, eluídas com a fase móvel 5 (c1 e c2).....	69
FIGURA 4. Cromatogramas de amostras plasmáticas brancas após extração por SPE nas condições 1 e 2 (a e b, respetivamente), eluídas com a fase móvel de tampão sulfato de sódio anidro: ACN: metanol (73: 22: 5, v/v/v).....	70
FIGURA 5. Cromatogramas obtidos das soluções brancas e fortificadas com Colistina (250 µg/mL) após derivatização com cloreto de dansilo na concentração de 0,15 mg/mL (a1 e a2, respetivamente) e na concentração de 0,30 mg/mL (b1 e b2, respetivamente).....	72
FIGURA 6. Cromatogramas obtidos das soluções brancas e fortificadas com Colistina (50 µg/mL), após eluição com 85% metanol e 15% 0,2% ácido acético glacial em água ultrapura (a e b, respetivamente).....	73
FIGURA 7. Cromatogramas obtidos das soluções diretas de Colistina nas concentrações de 0,125 µg/mL (a) e de 25 µg/mL (b), após eluição com metanol: 0,2% ácido acético glacial em água ultrapura (85: 15, v/v; 1,0 mL/min).....	74
FIGURA 8. Cromatogramas das amostras plasmáticas brancas e fortificadas com Colistina após precipitação proteica com ACN (a1 e a2, respetivamente), com a mistura metanol: 20% TCA (50:50, v/v) (b1 e b2, respetivamente) e com 20% TCA (c1 e c2, respetivamente).....	76
FIGURA 9. Cromatograma obtido da solução direta derivatizada contendo Colistina e PI, ambos na concentração de 18 µg/mL, após eluição com o sexto programa de gradiente.....	80
FIGURA 10. Cromatogramas representativos de extratos de plasma branco (a); plasma fortificado com PI (9,0 µg/mL) e sulfato de Colistina (0,9 µg/mL) (b); plasma fortificado com PI (9,0 µg/mL) e sulfato de Colistina (2,0 µg/mL) (c); plasma fortificado com PI (9,0 µg/mL) e sulfato de Colistina (40,0 µg/mL) (d); plasma fortificado com PI (9,0 µg/mL) e sulfato de Colistina (80,0 µg/mL) (e).....	81

FIGURA 11. Fármacos concomitantemente administrados com CMS aos doentes internados no CHUC.....	85
FIGURA 12. Cromatogramas obtidos da quantificação das amostras clínicas dos doentes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10.....	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Posologia da Colistina para diversas vias de administração e situações clínicas.....	30
TABELA 2. Compilação das diversas técnicas de HPLC e UPLC para a quantificação de Colistina em amostras biológicas.....	42
TABELA 3. Compilação dos diversos procedimentos de tratamento de amostras.....	50
TABELA 4. Programa de eluição por gradiente da fase móvel aplicado ao método HPLC-FL apresentado nesta dissertação.....	63
TABELA 5. Vias de administração, posologia e período de tempo decorrido entre a administração do CMS e a colheita de sangue.....	67
TABELA 6. Fases móveis testadas para a deteção por DAD.....	68
TABELA 7. Processo de extração e concentração da Colistina por SPE.....	70
TABELA 8. Programas de eluição da fase móvel por gradiente estudados na presente dissertação.....	78
TABELA 9. Precisão (% CV) e exatidão (% <i>bias</i>) para a determinação da Colistina total em amostras de plasma humano no LLOQ e nas concentrações baixa, média e alta da gama de concentrações, com um n=5.....	82
TABELA 10. Recuperação da Colistina total em plasma humano.....	83
TABELA 11. Estabilidade da Colistina em plasma humano, após aplicação do processo de tratamento otimizado.....	83
TABELA 12. Concentração de Colistina total em plasma dos doentes em estudo, após aplicação do método desenvolvido e apresentado nesta dissertação.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrilo

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AIF – Fator Indutor da Apoptose

APAF-I – Fator Apoptótico ativador de protease-I

ARNm – Ácido Ribonucleico mensageiro

ATP – Adenosina Trifosfato

AUC – Área Sob a Curva Concentração Plasmática *versus* Tempo

Bias – Desvio do Valor da Concentração Nominal

BGN-MR – Bactérias Gram-Negativo Multi-Resistentes

CHUC – Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra

CL_{NR} – *Clearance* Não Renal

CL_R – *Clearance* Renal

CL_T – *Clearance* Total

C_{máx} – Concentração máxima

C_{min} – Concentração mínima ou no “vale”

CMS – Colistimetato de sódio

CQ – Controlo da Qualidade

CQ_{DIL} – Controlo da Qualidade de Diluição

CQ_{LOQ} – Controlo da Qualidade no Limite da Quantificação

CrS – Creatinina Sérica

CV – Coeficiente de Variação

cytC – Citocromo C

DAD – Detetor de Varrimento de Díodos

EARS-Net – Rede de Vigilância de Resistência Antibacteriana Europeia

EMA – Agência Europeia do Medicamento

EPA – Efeito Pós-Antibiótico

ESI – *Eletrospray* de ionização

Fas – Recetor da Morte

$f_{AUC: MIC}$ – Quociente entre AUC e MIC da fração de Colistina não ligada

FDA – *US Food and Drug Administration*

FL – Fluorescência

FMOCCl – Cloroformiato de 9-fluorenilmetil

$f_{T > MIC}$ – Tempo que a concentração de Colistina livre se encontra acima da MIC

g – Força Gravitica

g – Gramas

°C – Graus Celsius

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC-DAD – HPLC com Deteção por Varrimento de Díodos

HPLC-FL – HPLC com Deteção por Fluorescência

HPLC-MS/MS – HPLC com Deteção por Espetrometria de Massa

HPLC-UV – HPLC com Deteção por Ultravioleta

IM – Intramuscular

IU – Unidades Internacionais

IV – Intravenosa

LLOQ – Limite Inferior de Quantificação

logP - Coeficiente de Partilha Óleo/Água

mg CBA – Miligrama de Atividade Base de Colistina

ME – 2-mercaptoetanol

MIC – Concentração Mínima Inibitória

MIU – Milhão de Unidades Internacionais

MS – Espectrometria de Massa

NA – Não Aplicável

NaOH – Hidróxido de Sódio

NE – Não Especificado

NH₄OH – Hidróxido de Amônio

OPA – Fetaldialdeído

PI – Padrão Interno

PK/PD – Farmacocinética/Farmacodinâmica

r² – Coeficiente de Determinação

RIFLE – Risco, Dano, Falha, Perda de Função Renal e Doença Renal em Estado Terminal

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SNC – Sistema Nervoso Central

SPE – Extração em Fase Sólida

TCA – Ácido Tricloroacético

t_{1/2} – Tempo de Semivida

TFA – Ácido Trifluoroacético

UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UPLC-ESI HRMS/MS – UPLC com Detecção por Espectrometria de Massa de Elevada Resolução

UPLC- MS/MS – UPLC com Detecção por Espectrometria de Massa

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

V_d – Volume de Distribuição

RESUMO

A Colistina é um antibiótico catiónico polipeptídico constituído por pelo menos 30 componentes, dos quais se destacam a Colistina A e a Colistina B, e possui 5 grupos amina primários que lhe conferem características básicas. Na prática clínica é administrada como tratamento de última linha para infeções por bactérias Gram-negativo multirresistentes, sob a forma de colistimetato de sódio, um profármaco aniónico e instável, que é rapidamente hidrolisado em Colistina, o metabolito farmacologicamente ativo. Hoje em dia, o desenvolvimento de resistência bacteriana à Colistina é uma realidade, principalmente pelas bactérias *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Deste modo, é de extrema importância a monitorização terapêutica da Colistina, não só pelo aumento constante das resistências antibacterianas, como também pela toxicidade desencadeada por este fármaco que, desde cedo, suscitou preocupação pelos profissionais de saúde. No Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, E. P. E. (CHUC, E. P. E.), a utilização deste fármaco tem vindo a crescer novamente, sendo que para a sua monitorização no plasma, é necessário recorrer a uma técnica sensível e seletiva, que atualmente ainda não se encontra disponível.

O objetivo principal do presente trabalho consistiu em desenvolver e validar uma técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que quantificasse, com exatidão e precisão, a Colistina em plasma humano, sendo posteriormente utilizada na monitorização sérica do mesmo fármaco em doentes internados no CHUC, E. P. E.. Deste modo, com esta técnica poder-se-á, no futuro, determinar as concentrações séricas de cada doente e a cinética da Colistina para individualizar o seu regime posológico, visando aumentar a eficácia e segurança do tratamento das infeções, ao mesmo tempo que se combate as resistências hospitalares.

A separação cromatográfica da Colistina A e B e do padrão interno (PI; cloridrato de anfetamina) foi alcançada em menos de 17 minutos, com recurso a uma coluna C_{18} de fase reversa a 30°C pela aplicação de um programa de eluição por gradiente utilizando uma fase móvel constituída por acetonitrilo (A) e água ultrapura (B). A deteção foi feita nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 343/500 nm. A curva de calibração foi linear ($r^2=0,993$) na gama de concentrações de 0,09-9,0 µg/mL e o limite de quantificação foi definido como sendo 0,09 µg/mL. A precisão global não ultrapassou os 13,85% e a exatidão variou entre os -3,83 e 14,49%.

A técnica de HPLC desenvolvida e apresentada nesta dissertação, permitiu a quantificação da Colistina em amostras plasmáticas de doentes, sem interferência dos fármacos concomitantemente administrados.

Palavras chave: HPLC. Colistina. Resistência antibacteriana. Farmacocinética. Farmacodinâmica. Monitorização sérica.

ABSTRACT

Colistin is a basic cationic polipeptidic antibiotic constituted by, more than 30 components, including Colistin A and Colistin B highlight. In the clinical practice is administrated in the for of sodium colistimethate (CMS) as the last treatment line against multidrug resistant Gram-negative bacteria infection. CMS is an anionic and instable prodrug, that is rapidly hidrolised into Colistin, the pharmacologic active metabolite. Nowadays, the Development of bacterial Resistance against Colistin is a reality, mostly for *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoneae* bacterias. Thus, the therapeutic monitoriting of Colistin is extremely important, due to the constant growth of the antibacterial resistance and the Colistin triggered toxicity, which early concerned the health professionals. In Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, E. P. E. (CHUC, E. P. E.), the use of this drug has been growing. It's serum monitoring, is essencial and to afford it a sensitive and selective technique is required.

The main objective of the present work consisted in the development and validation of an high performance liquid chromatography (HPLC) technique that quantified, with precision and accuracy, Colistin in human plasma, and it's further application in the serum monitorization hospitalized patients in CHUC, E. P. E.. Thus, this technique will be able, in the future, to determine the serum concentration of each patient and the Colistin's kinetic will be applied to individualize the dosing regimen, to improve the efficacy and the safety of infections treatment and, at the same time, fight against the hospital resistences.

Chromatographic separation of Colistin A and B and the internal standard (IS; amphetamine hydrochloride) was achieved in less than 17 minutes on a reverse phase C₁₈ column at 30°C by applying a gradient elution program using a mobile phase constituted of acetonitrile (A) and ultrapure water (B). The detector was set at excitation/emission wavelengths of 343/500 nm. The calibration curve was linear ($r^2=0,993$) in the concentration range of 0,09-9,0 µg/mL and the quantification limit was established at 0,09 µg/mL. The overall precision did not exceed 13,85% and the accuracy was within -3,83 e 14,49%.

The high performance liquid chromatography with fluorescence detection developed and here presented in this dissertation, allowed the Colistin quantification in patient's plasmatic samples, without interference from the coadministrated drugs.

Keywords: HPLC. Colistin. Antibacterial Resistance. Pharmacokinetic. Pharmacodynamic. Serum monitoring.

I. Objetivos

- Revisão bibliográfica sobre as técnicas de HPLC disponíveis na literatura nacional e internacional para quantificar a Colistina em matrizes biológicas, comparando com outras como as técnicas químicas, biológicas, eletroforéticas e imunológicas;
- Conhecer e perceber os parâmetros experimentais exigidos por *guidelines* internacionais para validar técnicas analíticas;
- Desenvolver uma técnica de HPLC que permita a quantificação da Colistina em plasma humano;
- Otimização do processo de extração de Colistina de amostras de plasma humano;
- Validação completa da técnica de HPLC-FL para quantificar Colistina em amostra de plasma humano;
- Aplicar a técnica supracitada para quantificar Colistina em doentes internados no CHUC, E. P. E. aquando sujeitos a monitorização sérica;
- Avaliar as concentrações séricas obtidas;
- Relacionar as concentrações séricas obtidas com o estado e características fisiopatológicas de cada doente, de forma a ajustar e otimizar o regime posológico dos doentes.

2. Colistina

2.1. Perspetiva histórica

Na última década, tem-se presenciado um aumento dramático das resistências antibacterianas (THEURETZBACHER, 2014) devido ao aumento exponencial de patógenos com limitada ou nenhuma suscetibilidade aos tratamentos disponíveis (LIM et al, 2010). A resistência antibacteriana é considerada o maior desafio médico em cuidados de saúde (THEURETZBACHER, 2014), podendo afirmar-se que se atravessa uma crise de saúde mundial (LIM et al, 2010), principalmente no que diz respeito às infeções por bactérias Gram-negativo. Esta realidade resulta do facto de as opções terapêuticas existentes não serem eficazes para o tratamento de infeções provocadas pelas referidas bactérias (LIM et al, 2010) e por a síntese de antibióticos novos com ação contra bactérias Gram-negativo multi-resistentes (BGN-MR) ocorrer a uma velocidade lenta que não acompanha o crescimento exponencial do número de resistências bacterianas (THEURETZBACHER, 2014).

Deste modo, antibióticos clássicos outrora comercializados, mas entretanto esquecidos e descartados, têm retornado recentemente (BERGEN, LI, NATION, 2011) como terapêutica de última linha em muitas situações de infeção por BGN-MR (LIM et al, 2010). No entanto, estes antibióticos não foram caracterizados de acordo com os processos atualmente existentes e a realidade de hoje no que diz respeito à incidência do desenvolvimento de resistências antibacterianas é muito díspar daquela observada quando foram introduzidos no mercado. Consequentemente, o regime posológico tem de ser atualmente redefinido de forma a otimizar a terapêutica, evitando o aparecimento de *outcomes* negativos, como o desenvolvimento de resistência em caso de dosagens subterapêuticas, e o desenvolvimento de toxicidade em caso de dosagens supraterapêuticas (THEURETZBACHER, 2014). Um antibiótico antigo que atualmente começa a integrar-se no arsenal de antimicrobianos de última linha para o tratamento de infeções por BGN-MR é a Colistina (KASSAMALI, DANZIGER, 2015). Inicialmente era utilizada no tratamento de infeções por bactérias Gram-negativo, no entanto a partir dos anos 70 o seu uso tornou-se restrito, dando preferência a novos agentes antibacterianos menos tóxicos, desencadeando o declínio na sua utilização clínica até aos primeiros anos de 2000 (BISWAS et al, 2012). O declínio na prática clínica em humanos, foi acompanhado de um uso cada vez mais extenso em veterinária: topicamente para o tratamento de otites externas ou oralmente para o tratamento de infeções intestinais (MERCK MANUAL, 2015). No entanto, devido ao aumento da resistência a este fármaco, a

Agência Europeia do Medicamento (EMA) recomendou, em 2013, a utilização da Colistina apenas no tratamento daquelas patologias e não na profilaxia das mesmas (EMA, 2016).

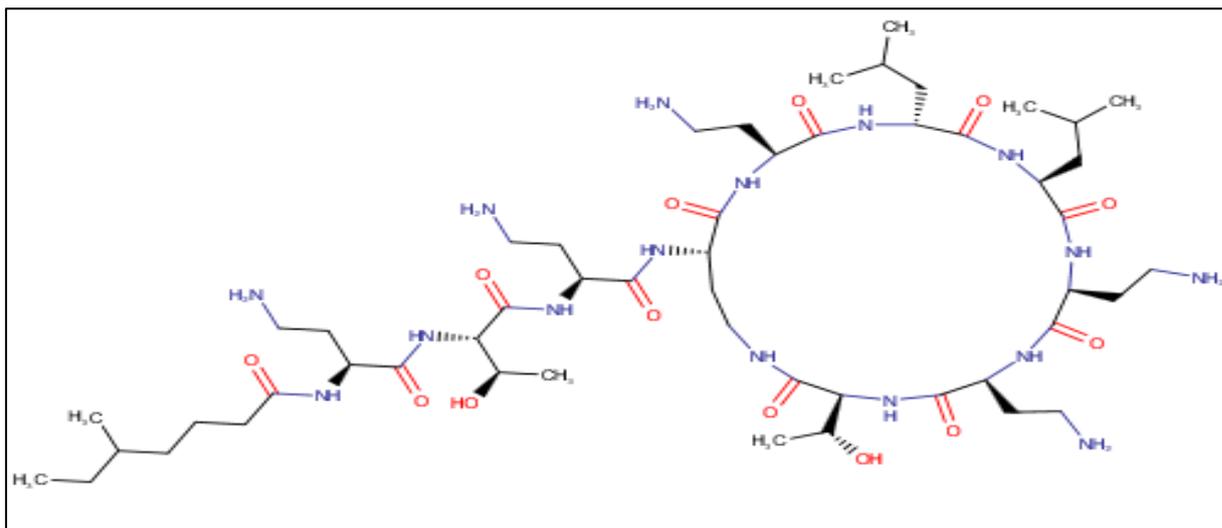
Atualmente, há duas formas de Colistina disponíveis no mercado: o sulfato de Colistina para administração tópica e oral e o colistimetato de sódio (CMS) para uso parentérico, tendo a segunda surgido para diminuir os efeitos tóxicos da Colistina quando administrada por via parentérica. Ambas as formas podem ser administradas por via inalatória (inalação ou nebulização).

2.2. Estrutura química

A Colistina, também conhecida por Polimixina E, é um antibiótico catiónico a pH fisiológico e um polipeptídico constituído por pelo menos 30 componentes, dos quais se destacam a Colistina A e a Colistina B (MOHAMED et al, 2012) (Polimixina E₁ e Polimixina E₂, respetivamente), e que pertence à família das Polimixinas. Sendo um produto da fermentação da bactéria *Bacillus polymyxa* subsp. *colistinus* (SIN et al, 2005), a Colistina foi descoberta no Japão em 1949 (MICHALOPOULOS, KARATZA, 2010), mas clinicamente começou a ser utilizada apenas nos anos 60 (MICHALOPOULOS, KARATZA, 2010) no tratamento de infeções graves por bactérias Gram-negativo (LIM et al, 2010). Nos anos 70, o seu uso passou a ser restrito devido à notificação de várias reações adversas tóxicas, mais especificamente de nefrotoxicidade e neurotoxicidade, e ao aparecimento de antibióticos menos tóxicos e mais fáceis de prescrever (MOHAMED et al, 2012).

A estrutura química da Colistina consiste num heptapeptídeo cíclico com uma cadeia lateral de 3 aminoácidos e um resíduo de ácido gordo no terminal N-acil (SIN et al, 2005), com a fórmula química C₅H₉₈N₁₆O₁₃ (DRUGBANK, 2005), e possui 5 grupos amina (WALLACE et al, 2013). A diferença entre a Colistina A e a Colistina B encontra-se no resíduo de ácido gordo, que no caso da Colistina A é o ácido 6-metiloctanóico e no da Colistina B é o ácido 6-metilheptanóico (Figura 1) (KWA et al, 2007).

Figura I - Estrutura química da Colistina (DRUGBANK, 2005).



O peso molecular da Colistina é de 1163 Da, apresentando um coeficiente de partilha óleo/água (logP) de -2,4 e um pKa de 11,6 (DRUGBANK, 2005). Desta forma, tem carga positiva a pH fisiológico, carácter anfipático e capacidade de se autoformar em água que a tornam altamente hidrossolúvel (WALLACE et al, 2013).

A Colistina e o CMS não devem ser confundidos como duas entidades químicas idênticas, nem permutadas na literatura ou na prática clínica. A Colistina, normalmente administrada sob a forma de sal sulfato, é um policatião a pH fisiológico, enquanto o CMS, usualmente utilizado sob a forma de sal sódico, é um polianião a pH fisiológico (LI et al, 2006) e o profármaco inativo da Colistina, ou seja, não tem atividade farmacológica, e resulta da reação dos 3 grupos amina livres dos resíduos de ácido diaminobutíricos da Colistina, com formaldeído e bissulfito de sódio (LI et al, 2006). O CMS não é estável *in vitro* ou *in vivo* e, desta forma, é hidrolisado em derivados metilsulfonados e Colistina, que é a entidade química mais estável (LI et al, 2006) e ativa. Desta forma o CMS não possui atividade antibacteriana, sendo apenas a forma como a Colistina é administrada na prática clínica. Por esse motivo, o foco da presente dissertação é a quantificação da Colistina e não do seu profármaco.

As diferenças supracitadas traduzem-se em distintos perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Enquanto o CMS é maioritariamente eliminado pelo rim e a excreção urinária envolve secreção tubular, a Colistina é eliminada predominantemente por via não renal por sofrer reabsorção tubular.

2.3. Propriedades farmacodinâmicas

2.3.1. Mecanismo de ação

Apesar de ter sido descoberta há mais de 50 anos, apenas recentemente é que o mecanismo de ação da Colistina foi descrito detalhadamente. Assim, a ação da Colistina inicia-se pela interação eletrostática dos seus componentes hidrofílico e lipofílico com a porção lipopolissacarídica da membrana bacteriana, ocorrendo competição catiónica e consequente permuta catiónica pelos lipopolissacarídeos membranares. Estas interações e permutas culminam na ruptura da membrana e na libertação dos lipopolissacarídeos e, consequentemente, a permeabilidade membranar aumenta e o conteúdo celular é libertado, ocorrendo a lise e morte das células bacterianas (LIM et al, 2010).

A concentração mínima inibitória (MIC) da Colistina é determinada *in vitro* através da inoculação de bactérias em meio de cultura, e corresponde à concentração mínima de antibiótico capaz de inibir o crescimento do patógeno exprimindo a potência do antibiótico contra os microrganismos (MOUTON et al, 2011). Define-se, atualmente, para a Colistina como sendo de 4 mg/mL (MICHALOPOULOS, KARATZA, 2010). Para efeitos clínicos e de monitorização terapêutica, quando a concentração plasmática é superior à MIC (valor laboratorial) o doente responde eficazmente à infeção. No entanto, os regimes posológicos praticados frequentemente não atingem a MIC, originando apenas concentrações subterapêuticas que promovem a necessidade de aumentar as doses administradas, que em determinadas circunstâncias patofisiológicas podem conduzir a efeitos tóxicos graves (MICHALOPOULOS, KARATZA, 2010).

2.3.2. Eficácia, espectro de atividade e uso clínico

A Colistina, tal como referido anteriormente, sofreu um grande declínio na sua utilização na prática clínica, mas foi recuperada nos últimos 10 anos para o tratamento de infeções por BGN-MR. Numerosos ensaios clínicos recentes confirmam que a Colistina é um agente antibacteriano eficiente no tratamento de infeções sistémicas graves, nomeadamente pneumonias hospitalares, infeções broncopulmonares em doentes com fibrose quística e infeções complicadas do sistema urinário (GENERIS, 2013), por bactérias Gram-negativo como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*, com um perfil de segurança aceitável (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011). No entanto, a Colistina também possui atividade contra *Enterobacter species*, *Escherichia coli*, *Salmonella species*, *Shigella*

species, *Citrobacter* species, *Yersinia pseudotuberculosis* e *Haemophilus influenzae* (BASSETTI, 2016). É possível concluir que o espectro de atividade da Colistina engloba a maioria das bactérias Gram-negativo aeróbicas, podendo ser administrada com segurança e eficácia a adultos, crianças e recém-nascidos de termo e/ou prematuros (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011).

Como é um fármaco de última linha, a Colistina é frequentemente administrada a doentes em estado grave. Num estudo de coorte retrospectivo de 2010, envolvendo 258 adultos, a Colistina foi administrada por via intravenosa (IV) pelo menos durante 72 horas, diminuindo o tempo de internamento dos doentes em unidades de cuidados intensivos, que apresentaram uma taxa de cura de 79,1% e uma taxa de indução de nefrotoxicidade de apenas 10% (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011).

Apesar de demonstrar ser eficiente e segura, a terapêutica com Colistina não atinge frequentemente o máximo da sua eficácia por falta de um regime posológico otimizado. De facto, os regimes posológicos hoje em dia praticados revelam que a concentração plasmática mínima de Colistina frequentemente não alcança o valor da MIC, não promovendo um efeito bactericida completo (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011). Desta forma, para que se obtenha um tratamento mais eficaz, deve considerar-se a administração de Colistina em doses mais elevadas por um período de tempo mais longo, sem se aumentar quer a prevalência de resistência à Colistina (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011), quer a sua toxicidade requerendo, desta forma, a individualização posológica através da monitorização sérica, isto é, através da determinação da concentração plasmática do antibiótico.

2.3.3. Toxicidade e contra-indicações

O principal motivo pelo qual a Colistina caiu em desuso na prática clínica durante décadas foi a sua toxicidade, que, desde cedo, preocupou os profissionais de saúde. Todavia, hoje em dia, é sabido que não é tão frequente quanto antes se acreditava (LIM et al, 2010). A diferença entre as taxas de toxicidade encontradas deve-se, maioritariamente, às diferenças das características clínicas dos doentes e aos diferentes métodos de quantificação usados para definir atualmente a toxicidade (KASSAMALI, DANZIGER, 2015). As características clínicas dos doentes incluem a severidade da doença aquando do início da terapêutica, possíveis comorbilidades, a extensão, o local e a causa da infeção e, ainda, a virulência do agente infetante (KASSAMALI, DANZIGER, 2015). Relativamente às diferenças nos métodos de quantificação usados para definir a toxicidade, principalmente a nefrotoxicidade, estas incidem,

maioritariamente, na classificação RIFLE (risco, dano, falha, perda de função renal e doença renal em estado terminal). Esta classificação baseia-se na determinação da creatinina sérica (CrS) e do débito urinário do doente, e considera 3 classes de gravidade (risco, dano e falha) e 2 classes de *outcome* (perda de função renal e doença renal em fase terminal) (GIL, 2012). Ao longo dos anos os conhecimentos científicos têm evoluído e contribuindo para alterações das classificações como o RIFLE assim como os métodos de quantificação para definir toxicidade.

Os efeitos tóxicos induzidos pela Colistina incluem maioritariamente a nefrotoxicidade e a neurotoxicidade. A nefrotoxicidade é o efeito adverso mais preocupante dada a sua frequência e a sua severidade, sendo dependente da dose e possuindo fatores de risco, tais como, a duração da terapêutica, a idade do doente, a obesidade, o uso concomitante de fármacos nefrotóxicos e doença renal pré-existente (JUSTO, BOSSO, 2015). Por sua vez, a neurotoxicidade, apesar de ser menos frequente e, conseqüentemente menos preocupante, é, igualmente, dependente da dose de fármaco administrada. Pode manifestar-se por diversas formas, tais como, parestesias periorais, apneia, náuseas, vômitos, tonturas, miopatias, neuropatias, confusão, psicose e convulsões (DAI et al, 2015). Tal como a nefrotoxicidade, também a neurotoxicidade possui uma componente que advém de fatores de risco, sendo eles a longa duração da terapêutica, administração de doses elevadas e a disfunção renal, que muitas vezes pode ser consequência da toxicidade renal induzida pelo próprio fármaco (JUSTO, BOSSO, 2015).

Inicialmente os mecanismos subjacentes à toxicidade desencadeada pela Colistina não eram totalmente conhecidos, sendo que apenas nos últimos anos é que estes têm vindo a ser melhor estudados e melhor descritos. Anteriormente pensava-se que o mecanismo de indução de nefrotoxicidade pela Colistina se devia à acumulação do fármaco nas células renais, principalmente pelas células dos túbulos proximais, promovendo disfunção renal (JUSTO, BOSSO, 2015). Relativamente à neurotoxicidade induzida pela Colistina, esta pensava-se ser devida a três possíveis mecanismos, baseados no bloqueio muscular como a inibição simpática da libertação da acetilcolina, a inibição competitiva da acetilcolina ou a despolarização prolongada dos neurónios, que culminaria na depleção de cálcio (JUSTO, BOSSO, 2015).

No entanto, hoje em dia é sabido que estes factos não são totalmente verdade. Estudos recentes indicam que o mecanismo de indução de nefrotoxicidade se deve à ativação de três vias de sinalização diferentes, mas todas relacionadas com a atividade das caspases nas células tubulares proximais renais (DAI et al, 2014). Uma das referidas vias de sinalização é a via

extrínseca ou via do recetor da morte, que é ativada pela ligação do recetor Fas (recetor da morte), uma glicoproteína transmembranar do tipo I, ao seu ligando Fas-L. Esta ligação ativa duas caspases: a caspase-8 iniciadora que pode ativar a clivagem da Bid, uma proteína interativa mitocondrial da família das Bcl-2, formando a tBid (AZAD et al, 2015; DAI et al, 2014); e a caspase-3 executora que é responsável pela apoptose e necrose celulares (DAI et al, 2014). Outra via de sinalização para a indução de nefrotoxicidade é a via intrínseca ou via mitocondrial. A mitocôndria é o organelo que produz a maior quantidade de Adenosina Trifosfato (ATP) intracelular, sendo um grande alvo para as espécies reativas de oxigénio (ROS) (DAI et al, 2014). É regulada por proteínas pró- e anti-apoptóticas da família das Bcl-2, como é o caso da Bax e da Bcl-2, respetivamente. Aquando de um estímulo pró-apoptótico, como exposição a um fármaco ou a uma toxina, ocorre a subregulação da Bcl-2 e a suprarregulação da Bax que promove a indução da permeabilidade da membrana mitocondrial exterior, e a diminuição do potencial membranar mitocondrial e da atividade da cadeia respiratória, culminando na libertação do citocromo C (cytC) e do ATP mitocondrial (DAI et al, 2014). O cytC liga-se ao fator apoptótico ativador de protease-I (APAF-I) e à pró-caspase-9 formando o apoptossoma, que promove a ativação da caspase-9 que por sua vez, ativa a caspase-3 executora (AZAD et al, 2015). No entanto o *stress* mitocondrial, consequência do estímulo apoptótico, não se deve apenas à libertação do cytC mas também à remodelação da ultraestrutura da mitocôndria. Esta remodelação consiste na transição da morfologia mitocondrial filamentosa (normal) para uma morfologia mitocondrial fragmentada (em *stress*). A remodelação da ultraestrutura da mitocôndria está associada à perda de potencial membranar mitocondrial e à produção de ROS (AZAD et al, 2015). As vias extrínseca e intrínseca interagem entre si através da tBid (via extrínseca), que ativa a via de sinalização apoptótica mitocondrial, promovendo a libertação de cytC (via intrínseca) (AZAD et al, 2015). A terceira via de sinalização ainda não se encontra muito estudada, mas é iniciada pelo *stress* do retículo endoplasmático, não se sabendo se esta ativação é primária ou secundária à terapêutica com Colistina (DAI et al, 2014).

Tal como o mecanismo de nefrotoxicidade induzida pela Colistina, também o mecanismo de indução de neurotoxicidade da Colistina envolve o dano e a apoptose de células neuroniais. Também aqui ocorre a ativação de duas vias de sinalização presentes no mecanismo de nefrotoxicidade: a via extrínseca ou via do recetor da morte e a via intrínseca ou via mitocondrial (DAI et al, 2015; JIANG et al, 2014). A via extrínseca é iniciada após a interação, à superfície da membrana, do recetor Fas ao ligando Fas-L cuja expressão está aumentada durante o tratamento com Colistina (JIANG et al, 2014). Desta interação resulta a ativação da

caspase-8, cuja atividade e níveis de ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) estão aumentados em caso de terapêutica com Colistina (DAI et al, 2015), promovendo a clivagem da Bid em tBid (JIANG et al, 2014). A proteína tBid sofre translocação para a membrana mitocondrial onde promove a libertação do cytC, ativando assim a via de sinalização das caspases (caspase-9, caspase-8 e caspase-3) (JIANG et al, 2014). A caspase-3 é uma caspase executora, e deste modo ativa a apoptose celular (JIANG et al, 2014) que, por ser caspase-dependente, inibe o processo autofágico (DAI et al, 2015) que degrada proteínas citoplasmáticas e macromoléculas dentro de lisossomas (LEE et al, 2015). Este processo, em condições patológicas, tem como função regular a apoptose celular, possuindo um papel protetor na sobrevivência celular (LEE et al, 2015). Uma vez inibido perde a sua função protetora e as células ficam expostas ao dano, culminando em toxicidade. Por sua vez, a via intrínseca é ativada por estímulos apoptóticos e, tal como referido anteriormente, regulada por proteínas pró- e anti-apoptóticas localizadas na mitocôndria, que também detêm a função de regular a permeabilidade membranar desta aos fatores apoptóticos (JIANG et al, 2014). Deste modo, as proteínas anti-apoptose Bcl-2 e a Bcl-xL mantêm a integridade mitocondrial, enquanto as proteínas pró-apoptose, como a Bax e a Bad, em resposta a estímulos apoptóticos sofrem translocação, formando poros membranares na mitocôndria que alteram a sua integridade membranar (JIANG et al, 2014). A alteração da integridade membranar é acompanhada pela diminuição do potencial membranar mitocondrial, induzida pela Bax, ocorrendo a libertação do fator indutor de apoptose (AIF) e do cytC (JIANG et al, 2014). O AIF encontra-se relacionado com a apoptose independente de caspases e, após a sua libertação da mitocôndria, é translocado para o citosol e deste para o núcleo, onde se liga ao ácido desoxirribonucleico (ADN) e induz a fragmentação da cromatina e do ADN (JIANG et al, 2014). A libertação do cytC, relacionado com a apoptose dependente de caspases, é o culminar de uma via de sinalização que se inicia pela indução do aumento de ROS pela mitocôndria. Este aumento dos níveis de ROS induz o dano no ADN, ativando o p53 que induz a libertação do cytC (JIANG et al, 2014). O cytC libertado ativa a via de sinalização das caspases, ativando as caspases-8, -9 e -3, induzindo a apoptose celular (DAI et al, 2015). O p53 não é apenas importante na libertação do cytC, mas também na mediação das vias de sinalização cruzadas, isto é, entre a via mitocondrial e a via do recetor da morte e, ainda, na regulação da expressão do gene codificador para a caspase-8 (DAI et al, 2015).

Resumindo, a nefrotoxicidade e a neurotoxicidade induzidas pela Colistina podem ser despoletadas pelas vias extrínseca e intrínseca que, por ativação da caspase-3, induzem

apoptose celular, comprometendo o sistema renal e o sistema nervoso central (SNC) afetando, desta forma, a farmacocinética e a segurança da Colistina.

À semelhança da maioria dos fármacos, face à sua toxicidade, a administração da Colistina tem de ser bastante ponderada, sendo contraindicada em determinadas patologias. Assim sendo, a Colistina encontra-se contraindicada em doentes com hipersensibilidade à substância ativa (Colistina) e à Polimixina B e em doentes com miastenia *gravis* (GENERIS, 2013), uma doença autoimune caracterizada por episódios de debilidade muscular por anormal funcionamento do sistema neuromuscular (MELDAU, 2006).

2.3.4. Desenvolvimento de resistências antibacterianas

Hoje em dia já existem relatos de resistências bacterianas à Colistina, principalmente desenvolvidas por bactérias como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Estes relatos são devastadores pois a Colistina é uma terapêutica de última linha de tratamento, não existindo outras opções terapêuticas (LIM et al, 2010). No entanto, para além dos problemas adjacentes à resistência à Colistina, existe um problema maior que tem vindo a ser reportado, a heterorresistência (LIM et al, 2010), que ocorre quando, numa estirpe de bactérias suscetíveis à Colistina, existe uma subpopulação com suscetibilidade reduzida, sem haver alteração da MIC (LIM et al, 2010).

Devido ao aumento da incidência de infeções provocadas por BGN-MR a Rede de Vigilância da Resistência Antibacteriana Europeia (EARS-Net) publicou em 2014 um relatório sobre a resistência antimicrobiana em 29 países da região económica europeia, no qual refere um aumento significativo na percentagem de resistência a fármacos de 3ª geração (cefalosporinas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos) por bactérias Gram-negativo, nomeadamente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, no período de tempo compreendido entre 2011 e 2014 (EARS-NET, 2014). Este aumento significativo num curto período de tempo promoveu o aumento da utilização de antibióticos como os carbapenemes e, em 2014, 7,3% da média populacional na região económica europeia era resistente a *Klebsiella pneumoniae* e apenas 0,1% o era para a *Escherichia coli* (EARS-NET, 2014). De salientar que países com maior percentagem de resistência a antibióticos de 3ª geração, também apresentavam elevada percentagem de resistência aos carbapenemes (EARS-NET, 2014).

O EARS-Net também conduziu a análise da resistência às Polimixinas, incluindo a Colistina, em estirpes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter*

spp.. Dos 29 países da região económica europeia, apenas 5 apresentaram informação sobre os testes de suscetibilidade antimicrobiana em *Escherichia coli* para as Polimixinas: 0,6% dos isolados era resistente às Polimixinas, 4,4% dos isolados era carbapeneme e Polimixina resistentes e 0,5% dos isolados era suscetível aos carbapenemes, mas Polimixina-resistentes (EARS-NET, 2014). Apenas 5 países apresentaram resultados de testes de suscetibilidade bacteriana em *Klebsiella pneumoniae* para as Polimixinas: 8,2% dos isolados eram Polimixina resistente, 29% dos isolados era carbapeneme e Polimixina resistentes e 3,0% dos isolados era suscetível aos carbapenemes, mas resistentes às Polimixinas (EARS-NET, 2014). Dos isolados resistentes aos carbapenemes e às Polimixinas, 5,2% também era resistente às fluoroquinolonas, às cefalosporinas de 3ª geração e aos aminoglicosídeos (EARS-NET, 2014). Dezoito países apresentaram informação dos testes de suscetibilidade bacteriana em *Pseudomonas aeruginosa* e 20 países apresentaram a referida informação em *Acinetobacter* spp para as Polimixinas, resultando em 2,0% e 4,0% dos isolados resistentes a esta família de antibióticos, respetivamente (EARS-NET, 2014).

Os mecanismos de resistência à Colistina parecem ser desencadeados por processos mutacionais que ocorrem no material genético bacteriano e que permitem desenvolver resistência cruzada completa à família das Polimixinas (LIM et al, 2010). Os processos mutagénicos culminam na alteração da membrana bacteriana (alvo da ação da Colistina), por meio dos sistemas reguladores PmrA-PmrB e PhoP-PhoQ, que permitem à bactéria responder às alterações do meio ambiente através da modificação da expressão génica da estrutura da superfície lipopolissacarídica (LIM et al, 2010). Dois fatores do meio ambiente que promovem a alteração da expressão génica que conduz ao desenvolvimento de resistência são o pH e a concentração de magnésio (LIM et al, 2010). Assim sendo, em ambiente ácido ($\text{pH} < 7$) com concentrações baixas de magnésio, os sistemas PmrA-PmrB e PhoP-PhoQ são ativados, promovendo a modificação dos lipopolissacarídeos membranares da bactéria, bem como o aumento da expressão do gene OprH (LIM et al, 2010). Os genes PmrA-PmrB-OprH formam um operão controlado pelo gene PhoP, sendo que o gene OprH é o gene que codifica para a proteína membranares OprH que detém a função de ocupar os locais membranares do magnésio, reduzindo os locais de ligação da Colistina (LIM et al, 2010). Desta forma, devido à modificação dos lipopolissacarídeos membranares da bactéria e à ocupação dos locais membranares do magnésio pela proteína OprH, a ligação da Colistina fica comprometida e os patógenos adquirem resistência ao fármaco.

A presença de poliaminas exógenas promove a indução da expressão do operão PmrA-PmrB-OprH aumentando, desta forma, a MIC do patógeno e, conseqüentemente, o desenvolvimento de resistência (LIM et al, 2010).

Nos estudos desenvolvidos para o melhor conhecimento do mecanismo de desenvolvimento de resistência à Colistina, foram descobertas alterações morfológicas e topográficas nas bactérias resistentes. Estas alterações caracterizam-se por uma forma mais esférica da bactéria, pela presença de uma membrana mais fina e pelo reduzido número e comprimento das suas vilosidades, que impede que as bactérias sejam capazes de formar um biofilme (LIM et al, 2010). Apesar deste conhecimento, mais esforços devem ser feitos no sentido de melhor conhecer estes mecanismos para que possam ser evitados ou bloqueados, travando o crescimento da incidência de fenômenos de resistência e da mortalidade por infecções sem terapêutica eficaz.

2.4. Formulações, vias de administração e dosagens

A Colistina encontra-se comercialmente disponível sob duas formas: sulfato de Colistina e CMS (DHARIWAL, TULLU, 2013). Tal como referido anteriormente, o sulfato de Colistina é um fármaco catiónico e estável, utilizado para administração tópica e inalatória (LIM et al, 2010). Por sua vez, o CMS é um profármaco inativo aniônico e instável, utilizado para administração parentérica e inalatória (LIM et al, 2010), sendo menos tóxico que o sulfato de Colistina (DHARIWAL, TULLU, 2013) e, por isso, mais utilizado. Quando administrado por via parentérica, enquanto profármaco, o CMS é rapidamente hidrolisado (LIM et al, 2010), formando uma mistura de compostos parcialmente sulfonados e a Colistina, ganhando, desta forma, atividade antibacteriana (MICHALOPOULOS, KARATZA, GREGORAKOS, 2011). Devido à sua frequente utilização, a sua farmacocinética encontra-se em estudo, para melhor compreender a extensão da hidrólise em Colistina e o seu impacto na farmacocinética do fármaco ativo.

Assim a Colistina pode ser administrada por diversas vias, tais como as vias IV, intramuscular (IM), inalatória, intratecal, intraventricular (MICHALOPOULOS, KARATZA, 2010; MICHALOPOULOS, KARATZA, GREGORAKOS, 2011) e ainda por via tópica (DHARIWAL, TULLU, 2013). A administração de Colistina por via oral não é contemplada uma vez que o fármaco não é absorvido no trato gastrointestinal (MICHALOPOULOS, KARATZA, GREGORAKOS, 2011).

A via parentérica é a via de administração de eleição em caso de infeção em doentes com fibrose quística, infeções graves por BGN-MR, sepsias e ainda em caso de doentes em terapia de substituição renal contínua ou em hemodiálise, mesmo não havendo informação clínica para o doseamento da Colistina (MICHALOPOULOS, KARATZA, GREGORAKOS, 2011).

A administração IM da Colistina é evitada por ser demasiado dolorosa e provocar irritação no local da injeção (DHARIWAL, TULLU, 2013), bem como por provocar efeitos adversos graves renais, neurológicos e alérgicos (MICHALOPOULOS, KARATZA, GREGORAKOS, 2011) tais como: insuficiência renal, necrose tubular aguda e hematúria; parestesias, insuficiência respiratória e apneia, náuseas e vómitos, tonturas, fraqueza muscular, neuropatia periférica, confusão, psicose e crises convulsivas; febre medicamentosa, eosinofilia e erupções macular e urticarial, respetivamente (KOCH-WESER et al, 1970).

Na prática clínica, recorre-se também à via inalatória com fins profiláticos ou terapêuticos (DHARIWAL, TULLU, 2013). No primeiro caso, o objetivo é controlar patógenos do trato respiratório em doentes com fibrose quística (DHARIWAL, TULLU, 2013), enquanto o seu uso no tratamento é destinado a doentes em estado grave, infetados com bactérias Gram-negativo a nível pulmonar, havendo a coadministração de terapêutica por IV (DHARIWAL, TULLU, 2013).

Pode recorrer-se às vias intratecal e intraventricular no tratamento de infeções no SNC por BGN-MR, em caso de meningite ou de ventriculite refratárias à terapêutica antibacteriana sistémica (MICHALOPOULOS, KARATZA, GREGORAKOS, 2011), uma vez que a Colistina possui uma capacidade limitada de penetrar no fluido cérebroespinal, pela baixa permeabilidade através da barreira hematoencefálica (DHARIWAL, TULLU, 2013; MICHALOPOULOS, KARATZA, GREGORAKOS, 2011). A meningite e a ventriculite são infeções comuns no SNC (MICHALOPOULOS, KARATZA, 2010), sendo a primeira uma inflamação das meninges, membranas que envolvem o cérebro (FELÍCIO), e a segunda uma inflamação dos ventrículos cerebrais (DICIONÁRIO SAÚDE, 2014).

Por fim, mas igualmente importante, a via tópica que se encontra reservada para o tratamento de infeções na pele (DHARIWAL, TULLU, 2013).

Relativamente às dosagens, estas exprimem o seu conteúdo tendo em conta o CMS, uma vez que a sua administração é menos tóxica quando comparada com a administração de Colistina (BERGEN, LI, NATION, 2011). No entanto, é difícil existir uniformidade quanto à posologia a utilizar, pois as doses recomendadas pela indústria farmacêutica variam de medicamento para medicamento e de acordo com a via de administração (NATION, LI, 2009).

Estas variações são sobre o conteúdo em CMS, podendo encontrar-se indicado sob duas formas: unidades internacionais (IU), sendo que um milhão de IU (MIU) são aproximadamente 80 mg de CMS; ou em miligramas de atividade base de Colistina (mg CBA), em que 1 MIU corresponde a cerca de 30 mg CBA, e 1 mg CBA são aproximadamente 2,7 mg de CMS (NATION et al, 2013). As unidades mais utilizadas são as IU, havendo posologias diferentes de acordo com a via de administração e a situação clínica (Tabela I).

Tabela I - Posologia da Colistina para diversas vias de administração e situações clínicas.

Fármaco	Dosagem	Referência	
Administração IV e IM			
CMS	Crianças e adultos com peso <60 kg	50000 a 75000 IU/kg/dia (8 em 8 horas)	DHARIWAL, TULLU, 2013
	Adultos com peso >60 kg	1 a 2 MIU/kg/dia: dose máxima de 6 MIU (8 em 8 horas)	GENERIS, 2013
Administração inalatória			
CMS	Indivíduos com peso <40 kg	500000 IU (12 em 12 horas)	DHARIWAL, TULLU, 2013
	Indivíduos com peso >40 kg	1 MIU (12 em 12 horas)	GENERIS, 2013
Administração intratecal e intraventricular			
CMS	10 mg	MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011	
Administração IV em doentes em estado grave			
CMS	Função renal normal	3 MIU (8 em 8 horas)	MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011
	Falha renal e níveis de CrS entre 1,3 e 1,5 mg/dL	2 MIU (8 em 8 horas)	

	Falha renal e CrS entre 1,6 e 2,5 mg/dL	2 MIU (12 em 12 horas)	
	Falha renal e CrS $\geq 2,6$ mg/dL	2 MIU (24 em 24 horas)	
	Terapêutica de substituição renal	2 MIU após cada análise e 2 MIU durante diálise peritoneal	

2.5. Propriedades farmacocinéticas

A farmacocinética da Colistina é bastante complexa. Como referido na secção anterior, a maioria das formulações utilizada na clínica contém CMS que, *in vivo*, é rapidamente hidrolisado, originando derivados sulfometilados e a Colistina, a entidade responsável pela ação antibacteriana. A farmacocinética do CMS e da Colistina, após administração IV do primeiro, demonstrou ser linear no intervalo de doses habitualmente utilizadas na prática clínica (BERGEN, LI, NATION, 2011).

2.5.1. Absorção

Por serem resistentes à pepsina, tripsina, pancreatina e erepsina e inativados pela lipase, nem a Colistina nem o seu profármaco (CMS) sofrem absorção gastrointestinal numa extensão apreciável (GENERIS, 2013; KWA et al, 2007).

O CMS é administrado, normalmente, por via IV conseguindo-se, desta forma, uma quantidade de profármaco máxima a nível plasmático (COUET et al, 2011) e um aparecimento rápido de Colistina no plasma. De facto, o pico plasmático da Colistina é atingido aproximadamente 10 minutos após administração do CMS por via IV (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011). No entanto, as formulações de CMS são também administradas por via inalatória (inalação ou nebulização) em doentes com fibrose quística, apresentando uma absorção considerável que deve ser monitorizada, uma vez que o CMS parece sofrer deposição após 3 ciclos de nebulização (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011), e conseqüentemente parece promover o desenvolvimento de efeitos adversos graves. A

absorção pulmonar é variável e dependente do tamanho da partícula do aerossol, do sistema nebulizador e do estado pulmonar do doente (GENERIS, 2013).

2.5.2. Distribuição

A ligação às proteínas plasmáticas da Colistina é reduzida (GENERIS, 2013), variando entre os 50% e os 74% (MOHAMED et al, 2012), apresentando uma ampla distribuição sistémica, excetuando-se o SNC e os fluidos sinovial, pleural e extravascular (MICHALOPOULOS, KARATZA, GREGORAKOS, 2011).

De forma similar, o CMS também possui uma baixa ligação às proteínas plasmáticas, e uma fraca distribuição no parênquima pulmonar, na cavidade pulmonar e nos fluidos pericardial e cerebrospinal (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011). No entanto, apresenta uma elevada capacidade de ligação às membranas lipídicas das células de vários tecidos do organismo, nomeadamente fígado, pulmões, rins, cérebro, coração e músculos (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011). Após ser administrado, o CMS sofre rápida hidrólise em Colistina devido à sua instabilidade, tal como referido anteriormente. Desta forma, ao fim de 10 minutos, a Colistina atinge a sua concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011).

O volume de distribuição (V_d) da Colistina varia de acordo com a patologia de base do doente. Num estudo envolvendo 13 doentes ventilados diagnosticados com pneumonia provocada por bactérias Gram-negativo, foi administrado CMS numa dose de 2 MIU de 8 em 8 horas durante, pelo menos, 2 dias (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011). O V_d no estado de equilíbrio foi de $1,5 \pm 1,1$ L/kg (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011). No entanto, doentes com fibrose quística revelaram valores muito inferiores (0,09 L/kg) (REED, et al, 2001). Em 2011, COUET et al estudaram a farmacocinética da Colistina em indivíduos saudáveis após a administração de CMS na dose de 1 MIU durante 1 hora de infusão, obtendo um V_d no estado estacionário de 0,17 L/kg (COUET et al, 2011), enquanto os indivíduos em estado crítico apresentaram valores muito diferentes, compreendidos entre 0,10 L/kg e 2,67 L/kg (COUET et al, 2011).

2.5.3. Eliminação

Após a administração parentérica de CMS, a disposição da Colistina parece ser limitada pela sua velocidade de eliminação e não pela velocidade à qual o CMS é hidrolisado. Este facto é sustentado pelo elevado tempo de semivida ($t_{1/2}$) da Colistina que se forma após a administração de CMS em comparação com o $t_{1/2}$ do profármaco.

De facto, este é rapidamente hidrolisado em Colistina, sendo cerca de 80% da dose administrada eliminada sob forma inalterada na urina, sem que haja excreção biliar (GENERIS, 2013). Deste modo apenas 20% da dose administrada exerce ação, assumindo-se que o fármaco remanescente é inativado nos tecidos (GENERIS, 2013).

Quando administrado em indivíduos saudáveis por via IV, o CMS apresenta um $t_{1/2}$ de 1,5-2 horas, e quando administrado por via IM possui um $t_{1/2}$ que varia entre as 2,75 e as 3 horas (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011). Em doentes, quando o CMS é administrado por via IV o seu $t_{1/2}$ aumenta para mais de 4 horas, e em doentes com anúria pode atingir 2-3 dias (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011). Por sua vez, o $t_{1/2}$ da Colistina é de aproximadamente 14,4 horas em doentes em estado grave, o que significa que a Colistina demora 14 horas e 24 minutos até que metade da dose administrada seja eliminada pelo organismo (COUET et al, 2011; MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011), indicando que a eliminação do antibiótico não é limitada pela sua formação (COUET et al, 2011). No entanto em doentes com septicémia, mas com função renal estável, o $t_{1/2}$ da Colistina diminuiu para 7,4 horas e para 7,5 h em doentes a fazer hemodiálise contínua (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011). Assim, é possível inferir que o CMS sofre, predominantemente, *clearance* renal (CL_R), enquanto a Colistina sofre *clearance* por mecanismos não renais, que não se encontram ainda totalmente caracterizados (LI et al, 2006).

A dose de CMS que é administrada possui uma *clearance* total (CL_T) de 6,180 L/h (COUET et al, 2011), sofrendo secreção tubular modesta nos rins (COUET et al, 2011). No entanto em doentes com falência renal, a excreção do CMS encontra-se diminuída, traduzindo-se num aumento da sua conversão em Colistina, culminando no aumento do $t_{1/2}$ desta (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011). Relativamente à CL_T da Colistina em doentes em estado grave, como por exemplo doentes com septicémia, existe grande variabilidade nos valores obtidos: segundo MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011, após a administração de CMS na dose de 225 mg durante, pelo menos, dois dias, a CL_T da Colistina é 13,6 L/h; enquanto que, segundo PLACHOURAS et al, 2009 e GARONZIK et al, 2011, o seu valor é 3,540 L/h e 1,380 L/h, respetivamente.

2.5.4. Fatores que afetam a farmacocinética da Colistina

A farmacocinética da Colistina depende da dosagem do medicamento, isto é, da quantidade de CMS no medicamento e da forma como a indústria o quantifica (MIU ou mg CBA) (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011), e é influenciada pela patologia de base do doente (insuficiência renal, patologia hepática, fibrose quística), devido às condições fisiológicas se encontrarem alteradas, modificando o comportamento do fármaco.

A farmacocinética do antibiótico varia com o volume extracelular corporal do doente uma vez que altera o V_d da Colistina, com a alteração da atividade enzimática, que culmina na alteração da *clearance* da Colistina, e com as flutuações da CL_R do CMS em doentes com infecção grave (DHARIWAL, TULLU, 2013; COUET et al, 2011), não sendo afetada pela *clearance* não renal (CL_{NR}) do CMS (COUET et al, 2011).

Assim sendo, é de extrema importância que a Colistina seja monitorizada para que se obtenha o máximo de benefício da terapêutica, com o mínimo de riscos possíveis para os doentes.

2.6. Interações farmacológicas

Devido à sua capacidade de promover e desenvolver efeitos tóxicos, nomeadamente nefrotoxicidade e neurotoxicidade, a Colistina não deve ser utilizada concomitantemente com outros fármacos com potencial nefro- e neurotóxico, para se evitar interações medicamentosas. Assim sendo, deve evitar-se o seu uso concomitante com antibióticos aminoglicosídeos, como a gentamicina, a amicacina, a netilmicina e a tobramicina, e com antibióticos da família das cefalosporinas (GENERIS, 2013). Pode ainda interagir farmacologicamente com fármacos diuréticos e fármacos bloqueadores neuromusculares, e ainda com a vancomicina (DHARIWAL, TULLU, 2013). Nestes casos, a Colistina deve ser administrada com extrema precaução e ser monitorizada (DHARIWAL, TULLU, 2013).

3. Monitorização terapêutica da Colistina

3.1. Considerações gerais

O problema do desenvolvimento de multirresistências pelas bactérias Gram-negativo é crescente e, não sendo paralelo com o desenvolvimento de novos antibióticos eficazes e seguros, relega os cuidados de saúde para uma era pré-antibiótico em várias regiões do mundo (GIAMARELLOU, 2010). Desta forma as infeções por BGN-MR, normalmente associadas a elevadas taxas de morbilidade e mortalidade, conduziram ao reaparecimento de antibióticos antigos, como é o caso da Colistina (SARKAR, DESANTIS, KUPER, 2007).

Este antibiótico passou, então, a ser utilizado como terapêutica de última linha neste tipo de infeções (THEURETZBACHER, 2014), no entanto a falta de um regime posológico ótimo estabelecido e a elevada variabilidade intra e interindividual não têm permitido a maximização de um efeito antibacteriano seguro (NATION et al, 2013). Como o efeito terapêutico não é atingido devido à posologia errada, em vez de se obter um *outcome* positivo (erradicação da bactéria) obtém-se um *outcome* negativo, que se traduz na diminuição da probabilidade de sobrevivência do doente pelo desenvolvimento de efeitos tóxicos característicos da Colistina (nefrotoxicidade e neurotoxicidade) bem como pelo desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana (BERGEN, LI, NATION, 2011; THEURETZBACHER, 2014). Desta forma, e também por não existir consenso na unidade de medida da dose, tal como já referido anteriormente na secção 2.4. nem no regime posológico recomendado pela indústria farmacêutica, é necessária a monitorização terapêutica da Colistina para estabelecer um regime posológico seguro e efetivo, bem como para detetar casos de subdosagem, que possam conduzir a um tratamento não efetivo e à emergência de resistência, e casos de sobredosagem, que possam aumentar os efeitos tóxicos (LIM et al, 2010).

Concluindo, a monitorização terapêutica da Colistina permitirá a otimização do regime posológico de acordo com as condições fisiopatológicas dos doentes e de acordo com a farmacocinética por ela apresentada (BASSETTI, RIGHI, 2013), melhorando o *outcome* terapêutico com a minimização dos efeitos tóxicos e do desenvolvimento de resistência quer pelo agente patogénico, quer pela flora do doente (MOUTON et al, 2011).

3.2. Monitorização da concentração da Colistina

3.2.1. Relação concentração-efeito

Os parâmetros farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD, do inglês *pharmacokinetic/pharmacodynamic*) dos antibióticos relacionam a potência do fármaco contra a bactéria (normalmente expressa pela MIC), a exposição do organismo ao fármaco (concentração disponível para exercer efeito ao longo do tempo) e os efeitos do antibiótico (MOUTON et al, 2011). A exposição à Colistina depende das propriedades farmacocinéticas desta e do regime posológico que, uma vez otimizado, permite atingir o objetivo terapêutico (MOUTON et al, 2011). Para se determinar a exposição sistêmica ao fármaco, o melhor parâmetro farmacocinético a utilizar é a área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (AUC), pois desta forma obtém-se a integração da concentração ao longo do tempo, que é representada pela exposição total à Colistina, habitualmente, durante 24 horas após a sua administração (MOUTON et al, 2011). No entanto, não é apenas a dose diária total e, consequentemente a exposição em 24 horas que determina o *outcome* terapêutico, mas também a frequência da administração (MOUTON et al, 2011). Desta forma, para a maioria das classes de fármacos, a AUC encontra-se relacionada com a ação terapêutica do composto; todavia isto não acontece com muitos antibióticos em que a eficácia é mais dependente do tempo em que a concentração do antimicrobiano se mantém acima da MIC do que da AUC sozinha (MOUTON et al, 2011). Desta forma, o *outcome* terapêutico é determinado pela exposição, pelo perfil da curva concentração-tempo e pela frequência da administração (MOUTON et al, 2011).

A Colistina possui atividade bactericida rápida e efeito pós-antibiótico (EPA) contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* (LIM et al, 2010), isto é, a Colistina promove a supressão do crescimento bacteriano durante um período de tempo que se estende para além do tempo em que a sua concentração inferior é superior à MIC para as referidas bactérias. O EPA referido é de 2-3 horas, após uma exposição à Colistina de 15 minutos, atingindo uma concentração 16 vezes superior à MIC (LI et al, 2001). Ou seja, mesmo para concentrações inferiores à MIC, o antibiótico continua a ser eficaz. Para a escolha da posologia ótima é necessário ter em conta não só a farmacocinética da Colistina, que varia de doente para doente, mas também a MIC dos patógenos, que varia de estirpe para estirpe (MOUTON et al, 2011). O parâmetro PK/PD mais preditivo da atividade da Colistina é o quociente entre a AUC e a MIC da fração de Colistina não ligada ($fAUC: MIC$) (LIM et al, 2010). Assim sendo, a Colistina é concentração e tempo dependente (NATION et al, 2009),

ou seja, o tempo de exposição à Colistina é um fator importante para a obtenção de concentrações elevadas, e quanto mais elevada for a sua concentração, maior é o seu EPA (MICHALOPOULOS, FALAGAS, 2011), podendo inferir-se que a terapêutica com Colistina atinge uma maior eficácia quanto maior for a exposição e/ou duração desta. No entanto, e devido aos efeitos adversos descritos na secção 2.3.3., quanto maior a duração da terapêutica e a exposição do organismo ao fármaco, maior o risco de desenvolvimento de nefrotoxicidade e neurotoxicidade, bem como maior probabilidade de desenvolver resistência ao fármaco. Recorrendo ao parâmetro $fAUC/MIC$, é possível obter a magnitude do efeito antibacteriano da Colistina e, conseqüentemente, delinear um regime posológico ótimo (BERGEN, LI, NATION, 2011), sem aumentar o risco de desenvolvimento de resistência e de toxicidade. O tempo que a concentração de Colistina livre se encontra acima da MIC ($fT > MIC$) é também um bom preditor da eficácia do tratamento com a Colistina, no entanto não é o parâmetro PK/PD de eleição, devido à atividade bactericida do antibiótico ser concentração dependente (LIM et al, 2010).

Em infeções graves (endocardite, infeção em prótese, pneumonia associada a ventiladores) a densidade bacteriana é elevada e atenua a atividade bactericida da Colistina, implicando a administração de doses mais elevadas do antibiótico (LIM et al, 2010). Assim, para a otimização do regime posológico deve ser considerada a frequência de administração das doses que, na prática clínica, pode ser de 8 em 8 horas, de 12 em 12 horas e de 24 em 24 horas (LIM et al, 2010). Todos os intervalos de dosagem permitem a morte bacteriana total e reaparecimento da infeção similares, no entanto o regime de administração de 8 em 8 horas é o mais efetivo na minimização da resistência antibacteriana, sendo que esta aumenta de acordo com o aumento do intervalo de administração (LIM et al, 2010).

Concluindo, para que o regime posológico da Colistina seja otimizado é necessário estabelecer uma relação exposição-efeito que permita uma ação terapêutica ótima, com o mínimo de desenvolvimento de efeitos secundários e de resistências. No entanto, quanto maior a dose de CMS administrada, maior a concentração de Colistina, o que conduz ao aparecimento de efeitos tóxicos e ao comprometimento do estado clínico do doente. Caso se prolongue a terapêutica, aumenta-se a exposição e maior a probabilidade do desenvolvimento de resistência pelo patógeno e maior o risco de acumulação da Colistina no organismo, que pode culminar em nefro- e/ou neurotoxicidade. Assim sendo, para que se maximize a relação concentração-efeito da Colistina, o regime posológico deve permitir que se atinjam concentrações que erradiquem a bactéria do organismo no mínimo tempo possível, de forma que não sejam desenvolvidos *outcomes* negativos.

3.2.2. O que monitorizar e quando?

A monitorização da Colistina dever ser realizada em duas vertentes: uma monitorização analítica e uma monitorização física (LEXICOMP). A primeira implica a monitorização de parâmetros analíticos, sendo necessária a recolha de amostras sanguíneas para que se quantifique a concentração plasmática da Colistina (LEXICOMP), verificando-se se a dose administrada é ou não adequada para o doente. A recolha sanguínea para a quantificação da Colistina para efeitos de monitorização deve ser realizada imediatamente antes da administração da terceira dose de CMS, uma vez que só então a Colistina atinge o estado de equilíbrio e a concentração de CMS é mínima, o que corresponde à concentração mínima ou no “vale” (C_{\min}). Desta forma, diminui-se o risco de se superestimar a concentração de Colistina gerada pela hidrólise do CMS (NATION et al, 2013).

A monitorização física envolve o conhecimento do estado renal e histórico de alergias do doente, devendo monitorizar-se possíveis sinais de nefro- e/ou neurotoxicidade e ainda de toxicidade pulmonar em caso de administração de CMS por via inalatória (LEXICOMP). Devendo monitorizar-se também os níveis séricos de creatinina e de ureia e o volume urinário (LEXICOMP).

3.2.3. Como colher as amostras?

Em 2004, LI et al utilizaram tubos heparinizados para a recolha de amostras sanguíneas de forma a quantificar a Colistina, não se verificando interação com a heparina (LI et al, 2004).

3.2.4. Como determinar as concentrações séricas da Colistina?

Para se determinar as concentrações séricas da Colistina, recorria-se, inicialmente, a estudos microbiológicos. Porém, estes estudos não diferenciam o CMS administrado da Colistina formada por hidrólise (LI et al, 2004), culminando em informação errónea sobre as curvas temporais de concentrações séricas e urinárias do composto ativo, a Colistina, após administração parentérica do CMS (LI et al, 2006).

Assim, hoje em dia a determinação das concentrações séricas da Colistina em amostras biológicas é preferencialmente realizada por técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), uma vez que esta permite diferenciar a Colistina do seu profármaco bem como dos interferentes endógenos presentes na amostra de sangue colhida do doente (LI et al, 2006).

4. Quantificação da Colistina por HPLC

4.1. Considerações gerais sobre HPLC

Por se tratar de um método analítico capaz de, simultaneamente, separar diferentes espécies químicas estruturalmente semelhantes e que estão presentes na mesma amostra, o HPLC tem sido bastante utilizado na quantificação de Colistina em amostras biológicas (CHUST, 1990). A separação consegue-se por mecanismos de interação seletiva entre os vários constituintes da amostra e os da fase estacionária e da fase móvel (CHUST, 1990). Permite uma quantificação seletiva, exata, precisa e reprodutível do antibiótico, mesmo exigindo a realização de um processo trabalhoso de pré-tratamento da amostra, que a pode tornar morosa (GOBIN et al, 2010; JANSSON et al, 2009; TSAI et al, 2013).

O sistema cromatográfico é constituído por um sistema de bombagem (bomba) capaz de impulsionar a fase móvel sob elevada pressão; pela coluna cromatográfica (fase estacionária); um sistema de injeção (injetor) capaz de introduzir a amostra na coluna cromatográfica sem perda da pressão necessária para vencer a resistência desta (LÓPEZ, 2009); pelo sistema de deteção (detetor) e pelo sistema de registo e tratamento de dados (LÓPEZ, 2009; CHUST, 1990). A bomba deve permitir um fluxo estável e isento de pulsações (minimizando o ruído de fundo do detetor), possuir uma gama ajustável e não muito ampla de fluxos de pressão, ser capaz de suportar altas pressões, deslocar um volume constante (facilitando a análise quantitativa e qualitativa) e ser facilmente adaptável a condições de trabalho por gradiente (CHUST, 1990). A coluna cromatográfica é o constituinte mais importante e crítico do sistema cromatográfico (LÓPEZ, 2009; CHUST, 1990), uma vez que permite a separação dos componentes da amostra, através da retenção destes na fase estacionária e a posterior eluição dos mesmos com a fase móvel (LÓPEZ, 2009). Assim, a deteção e o tempo de retenção de cada composto dependem do tipo e força de interação que as moléculas estabelecem entre a fase estacionária e a fase móvel.

Existem diversos tipos de HPLC, sendo os principais a cromatografia de adsorção ou fase normal, a cromatografia de partição ou fase reversa, a cromatografia de exclusão, a cromatografia de intercâmbio iónico e a cromatografia de afinidade (LÓPEZ, 2009; CHUST, 1990). A cromatografia de fase normal caracteriza-se pela utilização de uma fase estacionária de elevada polaridade e de uma fase móvel de baixa polaridade (LÓPEZ, 2009; CHUST, 1990). Por oposição, a cromatografia de fase reversa baseia-se na partilha de eletrões entre a fase

estacionária e a amostra (CHUST, 1990), utilizando-se uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar (LÓPEZ, 2009). Este tipo de cromatografia é a mais utilizada para quantificar fármacos em amostras biológicas, uma vez que a maioria destes é lipofílico e se for quantificado por cromatografia de fase normal apresenta um tempo de retenção de tal forma reduzido que a sua quantificação não é exequível. A cromatografia de exclusão recorre à separação dos componentes da amostra pelo seu tamanho e forma em dissolução (LÓPEZ, 2009). Por sua vez, a cromatografia de intercâmbio iónico recorre à utilização de fases estacionárias com grupos ligantes carregados eletricamente, e que se encontram compensados pela presença de contra-íões com a função de manter a neutralidade da fase estacionária, sofrendo deslocação aquando da eluição dos componentes iónicos da amostra (LÓPEZ, 2009). A cromatografia de afinidade utiliza a fase estacionária ligada a um ligando de afinidade de natureza bioquímica, separando os componentes de natureza bioquímica da amostra, de forma reversível e seletiva (LÓPEZ, 2009).

Em diversas técnicas para a quantificação de fármacos em amostras biológicas não é possível a injeção direta da amostra no sistema cromatográfico, devido à existência de vários componentes endógenos que podem interferir com a deteção do composto em estudo, assim como as proteínas plasmáticas, que podem colmatar a coluna cromatográfica, promovendo o aumento da pressão e a degradação da fase estacionária (LÓPEZ, 2009). Desta forma, é necessário tratar as amostras biológicas, sendo que este tratamento varia de acordo com o tipo de tecido ou fluido biológico a analisar, bem como do fármaco de interesse (LÓPEZ, 2009). Os processos de tratamento de amostra mais utilizados são a diluição, a precipitação de proteínas, as extrações líquido-líquido, em fase sólida e por par iónico e a derivatização (LÓPEZ, 2009). A diluição é uma técnica muito utilizada para a análise de fármacos na urina pois, em condições normais, esta não possui proteínas, mas é muito concentrada e necessita de ser diluída, normalmente com água ou com fase móvel (LÓPEZ, 2009). A desvantagem desta técnica é o aumento do erro de quantificação, quer pelo erro da técnica cromatográfica quer pelo erro da diluição da amostra (LÓPEZ, 2009). Relativamente à extração líquido-líquido, é uma técnica realizada quando a amostra biológica é muito complexa, extraindo o analito através da diferente partição entre dois líquidos imiscíveis, normalmente aquosos, com recurso a um solvente orgânico e à agitação da mistura (LÓPEZ, 2009). É uma técnica trabalhosa, morosa e que requer a utilização de um padrão interno (PI), de forma a serem evitados erros de quantificação (LÓPEZ, 2009). Torna-se desvantajosa pela formação de emulsões, por não se adequar à extração de compostos hidrofílicos e por necessitar de um elevado volume de amostra e solvente orgânico (LÓPEZ, 2009). Este tipo de extração de

fármaco não é aplicado em amostras contendo Colistina. A extração por par iónico é utilizada para a quantificação de um composto iónico que é difícil de extrair com um solvente orgânico (LÓPEZ, 2009). Recorre à utilização de um contra-íão que formará um complexo neutro ao ligar-se ao composto, permitindo a extração deste com um solvente orgânico (LÓPEZ, 2009). Com este tipo de tratamento da amostra, é necessária a realização de uma cromatografia de par iónico (LÓPEZ, 2009). As técnicas de tratamento da amostra como a precipitação de proteínas, a extração em fase sólida e a derivatização encontram-se pormenorizadas nas secções 4.3.1., 4.3.2. e 4.3.3., respetivamente.

4.2. Condições cromatográficas para quantificar Colistina

Ao longo dos anos diversas técnicas de HPLC têm sido desenvolvidas com o propósito de quantificar Colistina em amostras biológicas. Apesar de todas deterem o mesmo objetivo, todas elas possuem variáveis que as distinguem umas das outras (Tabela 2).

Tabela 2 - Compilação das diversas técnicas de HPLC e UPLC para a quantificação de Colistina em amostras biológicas.

Ref	Matriz	Técnica	Volume da amostra	PI	Coluna	Fase móvel	Eluição	Fluxo	Deteção	Volume de injeção	Tempo de corrida
Li et al, 2001	Plasma humano	HPLC-FL	250 µL	Sulfato de netilmicina (5 mg/L em água)	Ultrasphere C ₁₈ (250x4,6 mm, 5 µm)	ACN: Tetrahydrofurano: Água (87:4:13, v/v/v)	Isocrática	1 mL/min	Excitação: 260 nm Emissão: 315 nm	50 µL	NE
Li et al, 2002	Plasma e urina de rato	HPLC-FL	Plasma: 150 µL Urina: 200 µL	Sulfato de netilmicina (5 mg/L em água)	Ultrasphere C ₁₈ (250x4,6 mm, 5 µm)	ACN: Tetrahydrofurano: Água (50:30:20, v/v/v)	Isocrática	1 mL/min	Excitação: 260 nm Emissão: 315 nm	100 µL	18 min
GMUR et al, 2003	Plasma de rato e cão	HPLC-FL	475 µL	NA	Zorbax Eclipse XDB C ₈ (150x3,0 mm, 5 mm)	Metanol: 0,2% Ácido acético glacial em água (83:13, v/v)	Isocrática	0,5 mL/min	Excitação: 344 nm Emissão: 518 nm	25 µL	11 min
SIN et al, 2005	Tecido e leite bovinos	HPLC-MS/MS	Leite: 1 mL Tecido: 0,5 g	Polimixina B	Altima BDS C ₁₈ (250x2,1 mm, 5 µm)	A) 0,1% Ácido fórmico em ACN B) Formiato de amónia saturado: Ácido fórmico: ACN: Água (1:5:50:950, v/v/v/v)	Gradiente	0,2 mL/min	Modo ESI positivo	10 µL/min (n=20)	20 min

MUNOZ, CASTRO, 2005	Alimentos	HPLC-FL	100 g	NA	Ultrabase C ₁₈ (250x4,6 mm, 5 µm)	ACN: Água (75:25, v/v)	Isocrática	1,5 mL/min	Excitação: 340 nm Emissão: 440 nm	20 µL	NE
LOZANO et al, 2007	Água potável (suspensão não aquosa)	HPLC-DAD	22 mL	NA	Kromasil C ₁₈ (150x4,6 mm, 5 µm)	Sulfato de sódio anidro: ACN (75:25, v/v)	Isocrática	1,5 mL/min	215 nm	20 µL	15 min
JANSSON et al, 2009	Plasma e meio de cultura cultura	HPLC-MS/MS	Plasma: 100 µL Meio de cultura: 50 µL	NA	Ultrasphere C ₁₈ (250x4,6 mm, 5 µm)	25% ACN em 0,03% TFA	Isocrática	1 mL/min	Modo ESI negativo	50 µL	10 min
JIN et al, 2009	Cérebro de murganho	HPLC-FL	280 µL (homogeneizado)	NA	Phenomenex Onyx monolítica C ₁₈ (5x4,6 mm)	ACN: Tetrahydrofurano: Água (50:25:25, v/v/v)	Isocrática	1 mL/min	Excitação: 265 nm Emissão: 315 nm	40 µL	9 min
GOBIN et al, 2010	Plasma e urina humanos	HPLC-MS/MS	Plasma: 250 µL + 100 µL Urina: 200 µL	Polimixina B ₁	XBridge C ₁₈ (150x2,1 mm, 5,0 µm)	0,1% Ácido fórmico em ACN (v/v): 0,1% Ácido fórmico em água (v/v) (20:80, v/v)	Isocrática	0,2 mL/min	Modo ESI positivo	20 µL	3,8 min
BAI et al, 2011	Solução de fármaco (contendo sulfato de Colistina e CMS)	HPLC-UV	Sulfato de Colistina: 5 mg CMS: 5 mg	NA	Optimapak C ₁₈ (150x4,6 mm)	A) ACN: 0,05% TFA em solução aquosa (20: 80, v/v) B) ACN: 0,05% TFA em solução aquosa (50: 50, v/v)	Gradiente	NE	214 nm	5 µL	8 min

IMBERTI et al, 2012	Fluido cerebrosplinal	HPLC-FL	250 µL	Sulfato de netilmicina	Zorbax SB-C ₁₈	ACN: Tetrahidrofurano: Água	Isocrática	I mL/min	Excitação: 260 nm Emissão: 315 nm	25 µL	NE
THOMAS et al, 2012	Plasma humano	HPLC-MS/MS	250 µL	Polimixina B ₁	Atlantis dC ₁₈ (50x2,1 mm, 3 µm)	A) 0,1% Ácido fórmico em água B) 0,1% Ácido fórmico em ACN	Gradiente	0,3 mL/min	Modo ESI positivo	10 µL	12 min
XU e al, 2012	Produtos de pesca	UPLC-MS/MS	5 ± 0,01 g	Polimixina B	Acquity BEH C ₁₈ (100x2,1 mm, 1,7 µm)	A) 0,2% Ácido fórmico em ACN B) 0,2% Ácido fórmico em água	Gradiente	0,2 mL/min	Modo ESI positivo	10 µL	5 min
GIKAS et al, 2013	Plasma humano	UPLC-ESI HRMS/MS	100 µL	Reserpina	Acquity BEH C ₈ (100x2,1 mm, 1,7 µm)	A) 0,5% Ácido acético em solução aquosa B) ACN com 0,5% ácido acético em solução aquosa	Gradiente	0,4 mL/min	ESI total	20 µL	4,5 min
TSAI et al, 2013	Plasma humano	UPLC-MS/MS	100 µL	Polimixina B	Kinetex C ₁₈ (50x2,1 mm, 2,6 µm)	A) 0,1% Ácido fórmico em água B) 0,1% Ácido fórmico em ACN	Gradiente	0,3 mL/min	Modo ESI positivo	10 µL	10 min
SORLI et al, 2013	Plasma humano	HPLC-FL	250 µL	Sulfato de netilmicina	Waters SunFire C ₁₈ (15,0x4,6mm, 5µm)	ACN: Tetrahidrofurano: Água (84:4:13, v/v/v)	Isocrática	I mL/min	Excitação: 260 nm Emissão: 315 nm	20 µL	20 min

MERCIER et al, 2014	Plasma humano	HPLC-MS/MS	1,2 mL	Sulfato de Polimixina B (1 µg/mL em água)	XBridge BEH (50x2,1 mm, 2,5 µm)	A) 10mM formiato de amônia em água com 0,4% ácido fórmico B) ACN com 0,1% ácido fórmico	Gradiente	0,3 mL/min	Modo ESI positivo	20 µL	7 min
CHEPYALA et al, 2015	Plasma humano	HPLC-FL	250 µL	Polimixina B ₁ (20 µg/mL)	Agilent Poroshell 120 EC-C ₁₈ (100x2,1 mm, 2,7µm)	ACN: Tetrahydrofurano: Água desionizada (82:2:6, v/v/v)	Isocrática	0,5 mL/min	Excitação: 260 nm Emissão: 315 nm	25 µL	22 min

ACN, acetonitrilo; ESI, *electrospray* de ionização; HPLC-DAD, HPLC com detecção por varrimento de díodos; HPLC-FL, HPLC com detecção por fluorescência; HPLC-MS ou HPLC-MS/MS, HPLC com detecção por espectrometria de massa; NA, não aplicável; NE, não especificado; TFA, ácido trifluoroacético; UPLC, cromatografia líquida de ultra eficiência; UPLC-ESI HRMS/MS, UPLC com detecção por espectrometria de massa de elevada resolução; UPLC-MS/MS, UPLC com detecção por espectrometria de massa.

4.2.1. Coluna cromatográfica

Tal como referido anteriormente, a Colistina possui elevado peso molecular e natureza polar positiva, sendo por isso ótima para ser quantificada por HPLC de fase reversa. Apesar da vasta gama de colunas cromatográficas disponíveis no mercado, observando-se a Tabela 2, verifica-se que são as colunas C_{18} de fase reversa que representam a preferência, uma vez que estas promovem a eluição rápida dos compostos polares, com um tempo de corrida relativamente curto (BICKER et al, 2013). As colunas C_{18} são utilizadas maioritariamente em cromatografia de fase reversa devido à sua elevada porosidade e área superficial (CHUST, 1990). O grupo funcional das colunas C_{18} , que se liga aos grupos hidroxilo (-OH) da sílica, é o octadecilsilano daí a abreviatura de C_{18} e a natureza apolar das mesmas (CHUST, 1990).

O outro tipo de colunas cromatográficas utilizado na quantificação da Colistina em amostras biológicas é a coluna C_8 , também de fase reversa. São menos hidrofóbicas que as colunas C_{18} , mas permitem aumentar a reprodutibilidade dos tempos de retenção e melhorar a separação e a resolução dos picos (BICKER et al, 2013).

4.2.2. Fase móvel

Para a escolha e otimização da fase móvel é necessário ter em conta a proporção dos solventes orgânicos, a eventual utilização de uma solução tampão em vez de água bem como a composição qualitativa e quantitativa da solução tampão e o valor final do pH (BICKER et al, 2013). O pH final da fase móvel está relacionado com o grau de ionização dos compostos a analisar que depende, por sua vez, dos valores de pKa, ou seja, dependendo dos valores de pH da fase móvel e do pKa dos compostos, estes podem deter diferentes cargas exibindo comportamentos cromatográficos distintos, afetando os tempos de retenção e a forma dos picos (BICKER et al, 2013). Na literatura, o pH da fase móvel utilizado para quantificar a Colistina varia entre os 2,5 e 10. Aliás este facto não é de estranhar tendo em conta que as colunas C_{18} e C_8 só podem ser usadas neste intervalo de pH. No entanto, a grande maioria dos tampões usados na fase móvel apresentam valores de pH superiores a 8,9, sendo os tampões carbonato e bicarbonato os mais utilizados.

No que se refere à eluição dos compostos, a eluição isocrática é mais utilizada do que a eluição por gradiente (Tabela 2). A eluição isocrática consiste na manutenção da composição da fase móvel durante a corrida, isto é, ao longo da corrida as proporções de fase orgânica e de fase aquosa não se alteram. Desta forma, a eluição isocrática é mais simples e não necessita

de tempo extra para reequilibrar a coluna entre corridas consecutivas (BICKER et al, 2013). Por outro lado, a eluição por gradiente consiste na alteração da proporção entre as fases orgânica e aquosa da fase móvel ao longo da corrida, permitindo uma melhor resolução dos picos em casos em que a eluição isocrática não permite a obtenção de picos com boa resolução e permite, ainda, separar e quantificar um grande número de compostos simultaneamente (BICKER et al, 2013).

4.2.3. Detecção

4.2.3.1. Detecção por fluorescência

A Colistina, por ser um polipeptídeo, não possui fluorescência (FL) nativa (JANSSON et al, 2009; LI et al, 2001), no entanto tal não impede que se recorra à deteção por FL com regularidade (Tabela 2). Para tal é necessário recorrer a um processo de derivatização antes de submeter a amostra a análise cromatográfica, requerendo-se a otimização da concentração do agente derivatizante, bem como da temperatura e do tempo da reação (BICKER et al, 2013).

Apesar do inconveniente consumo de tempo da reação de derivatização e de ser propensa a interferentes, a deteção por FL continua a ser uma técnica sensível, seletiva, confiável, de fácil execução e mais acessível do que a espectrometria de massa (MS) (BICKER et al, 2013).

4.2.3.2. Detecção por espectrometria de massa

O segundo sistema de deteção mais utilizado na quantificação da Colistina é a MS, que permite quantificar e identificar compostos por associar o tempo de retenção com a sua estrutura química (BICKER et al, 2013).

O seu funcionamento baseia-se na transição dependente da massa entre o precursor iónico e os iões produzidos (BICKER et al, 2013), onde a transição apenas é extraída após a ionização por eletrospray positivo ou negativo (BICKER et al, 2013). Desta forma, para se ionizar compostos básicos recorre-se à ionização por eletrospray positivo, e para se ionizar compostos ácidos utiliza-se a ionização por eletrospray negativo (BICKER et al, 2013). Como a Colistina possui carácter básico, devido a possuir 5 grupos amina (KASSAMALI, DANZIGER, 2015), aquando da sua deteção por MS, recorre-se à ionização por eletrospray positivo (Tabela 2).

A sensibilidade da detecção por MS depende da eficiência da ionização, que é afetada pelas características dos compostos, pelas variáveis cromatográficas e pela matriz (BICKER et al, 2013). Mesmo assim, a MS é uma alternativa versátil que permite a identificação de compostos de forma inequívoca e que possui um tempo reduzido de preparação da amostra (BICKER et al, 2013).

4.2.3.3. Detecção ultravioleta-visível

Apesar de a Colistina possuir uma baixa absorvância no ultravioleta (UV) (JANSSON et al, 2009; LI et al, 2001), a detecção por ultravioleta-visível (UV-Vis) é utilizada frequentemente, quer utilizando um detetor de UV quer um detetor de varrimento de díodos (DAD) (Tabela 2), uma vez que detêm a capacidade de identificar compostos como a Colistina de forma sensível e eficaz (LÓPEZ, 2009). No entanto, são instrumentos dispendiosos e que não permitem a eluição por gradiente, devido à alteração do índice de refração do meio (LÓPEZ, 2009).

A diferença nos detetores supracitados encontra-se na forma como a radiação incide na amostra a quantificar. No detetor de UV apenas a radiação com determinado comprimento de onda incide na amostra; no detetor de DAD a radiação incidente abrange uma gama de radiações.

4.2.4. Padrão interno

Com o objetivo de corrigir as perdas de analitos decorrentes durante o processo de preparação da amostra e as variações cromatográficas que podem alterar as características do pico, frequentemente utiliza-se um composto designado de PI, principalmente quando as amostras são complexas, como por exemplo o plasma e tecidos (LÓPEZ, 2009). O PI é um composto químico que idealmente deve apresentar com comportamento similar ao do analito a quantificar durante todo o processo de tratamento da amostra e cromatográfico. Por esta razão é, normalmente, estruturalmente similar ao composto. A quantidade adicionada é conhecida e mantida a mesma para todas as amostras.

Diversos padrões internos têm sido utilizados para o desenvolvimento e validação de técnicas analíticas com o objetivo de quantificar Colistina em amostras biológicas, sendo que a sua escolha pode depender do tipo de detecção utilizada (Tabela 2). Desta forma, caso se

opte por uma detecção por MS, os padrões internos devem ser isótopos estáveis e conhecidos, para que se obtenha uma melhor precisão e exatidão (BICKER et al, 2013), permitindo a quantificação de amostras com concentração de fármaco conhecida, após a aplicação do mesmo procedimento de preparação de amostras que contém o (s) composto (s) de interesse (LÓPEZ, 2009) e, ainda, verificar se as amostras possuem ou não interferentes e se o procedimento de preparação destas foi executado corretamente.

O PI mais utilizado é o sulfato de netilmicina (Tabela 2), sendo utilizado como PI para detecção por FL. A Polimixina B e a Polimixina B₁ são utilizados na mesma extensão, como PI para detecção por MS e por MS e FL, respectivamente (Tabela 2). No entanto, o sulfato de Polimixina B e a reserpina (Tabela 2) também são utilizados como padrões internos em técnicas cromatográficas para a quantificação de Colistina (Tabela 2), sendo ambos utilizados para detecção por MS (Tabela 2).

4.3. Técnicas de preparação de amostras

Para quantificar a Colistina em amostras biológicas, estas têm de ser previamente submetidas a um processo de tratamento antes da sua injeção no sistema de HPLC, de forma a eliminar interferentes endógenos da amostra e a aumentar a sua concentração na solução injetada (BICKER et al, 2013).

As técnicas contempladas na Tabela 2 apresentam procedimentos de tratamento de amostra que variam de técnica para técnica, e com o intuito de melhor os perceber foi elaborada a Tabela 3.

Tabela 3 - Compilação dos diversos procedimentos de tratamento de amostras.

Ref	Matriz	Volume	Preparação da amostra	Solvente
LI et al, 2001	Plasma humano	250 µL	Precipitação de proteínas	Metanol: 10% TCA (50:50, v/v)
			Diluição	1 M hidróxido de sódio
			Diluição	Metanol: 0,01 M ácido clorídrico (50:50, v/v)
			SPE (SPE C ₁₈) / Derivatização	Metanol e tampão carbonato / 100 mM FMO-CI em ACN
LI et al, 2002	Plasma e urina de rato	150 µL e 200 µL, respectivamente	Diluição	Ácido bórico
			Hidrólise	1,0 M ácido sulfúrico e 1,0 M de hidróxido de sódio
			SPE (Sep-Pak C ₁₈) / Derivatização	Metanol e tampão carbonato / 100 mM FMO-CI em ACN
			Diluição	Ácido bórico
GMUR et al, 2003	Plasma de rato	475 µL	SPE (placas 96-poços com discos C ₈)	Metanol e água
			Diluição	Metanol

MUNOZ, CASTRO, 2005				Precipitação de proteínas	50% metanol em solução aquosa
				Derivatização	OPA em metanol com tampão borato e ME
LOZANO et al, 2007	Suspensão veterinária	3 mL		Extração assistida por ultrassons	
				Homogeneização	NA
				Extração	Água
				Derivatização	OPA em metanol com tampão borato e ME
				Diluição	96% etanol
				Diluição	ACN: água (20:80, v/v)
				Diluição	Sulfato de sódio anidro: ACN (75: 25, v/v)
				Filtração	NA
				Precipitação de proteínas	ACN com 0,1% TFA
				Diluição	0,03% TFA
JIN et al, 2009	Cérebro de murganho	NE		Homogeneização	NA
				Precipitação de proteínas	5% TCA e ACN

			SPE (Sep-Pak C ₁₈) / Derivatização	Acetona, metanol e tampão carbonato / FMO-CI e metanol
GOBIN et al, 2010	Plasma e urina humanos	250 µL e 200 µL, respectivamente	Colistina	
			SPE (OASIS HLB SPE)	Metanol e água
			Diluição	0,1% ácido fórmico em água
			CMS	
			Hidrólise	0,5 M ácido sulfúrico em solução aquosa e 1 M hidróxido de sódio
BAI et al, 2011	Solução de fármaco (sulfato de Colistina e CMS)	5 mg (para ambos os fármacos)	SPE (OASIS HLB SPE)	Metanol e água
			Diluição	0,1% ácido fórmico em água
			Dissolução	0,05% TFA em solução aquosa
			Diluição	ACN
IMBERTI et al, 2012	Fluido cerebrospinal	250 µL	Precipitação de proteínas	TFA em solução aquosa (50:50, v/v)
			SPE (Sep-Pak C ₁₈) / Derivatização	Metanol e tampão carbonato / FMO-CI

			Reconstituição	Acido bórico e ACN: tetrahydrofurano: água
THOMAS et al, 2012	Plasma humano	250 µL	Diluição	Água
			SPE	Metanol e água
			Reconstituição	0,1% ácido fórmico em água
XU et al, 2012	Produtos de pesca	5 g	Homogeneização	NA
			Precipitação de proteínas	Metanol: água (5:4, v/v)
			Diluição	10,0 mol/L ácido clorídrico
			Diluição	Água
			SPE (ProElut PLS)	Metanol e água
GIKAS et al, 2013	Plasma humano	100 µL	Diluição	Acido fórmico: ACN: água (0,2:10:90, v/v/v)
			Filtração	NA
			Colistina	
			Diluição	20% NH ₄ OH em solução aquosa
			SPE (OASIS HLB)	Metanol e água: 10% NH ₄ OH

			Reconstituição	Água: ACN (9:1): Reserpina (0,5 µg/mL)
			CMS	
			Hidrólise	0,5 M ácido sulfúrico e 1 M hidróxido de sódio
			Diluição	20% NH ₄ OH em solução aquosa
			SPE (OASIS HLB)	Metanol e água: 10% NH ₄ OH
			Reconstituição	Água: ACN (9:1): Reserpina (0,5 µg/mL)
TSAI et al, 2013	Plasma humano	100 µL	Precipitação de proteínas	ACN
			Diluição	0,1% ácido fórmico em solução aquosa
SORLI et al, 2013	Plasma humano	250 µL	Precipitação de proteínas	Metanol: 10% TCA (50:50, v/v)
			SPE (Sep-Pak C ₁₈) / Derivatização	Metanol e tampão carbonato / FMOC-Cl em ACN (10 Mm)
MERCIER et al, 2014	Plasma humano	180 µL	Hidrólise	1 M ácido sulfúrico e 2 M hidróxido de sódio
			SPE (placa de 96 poços OASIS HLB)	Metanol e água
			Disorbação	Metanol com 0,5% ácido fórmico

CHEPYALA et al, 2015	Plasma humano	250 µL	Precipitação de proteínas	20% TCA: metanol (50:50, v/v)
			Diluição	1 M NaOH
			Diluição	0,01 M ácido clorídrico: metanol (50:50, v/v)
			SPE (SPE C ₁₈) / Derivatização	Metanol e 1% tampão carbonato (pH=10) / 10 mM FMOC-Cl
			Filtração	NA

ACN, acetonitrilo; CMS, colistimetato de sódio; FMOC-Cl, cloroformiato de 9-fluorenilmetil; H₂SO₄, ácido sulfúrico; ME, 2-mercaptoetanol; NaOH, hidróxido de sódio; NA, não aplicável; NE, não especificado; NH₄OH, hidróxido de amônia; OPA, fetalaldeído; SPE, extração em fase sólida; TCA, ácido tricloroacético; TFA, ácido trifluoroacético.

4.3.1. Precipitação de proteínas

Este procedimento normalmente precede outros procedimentos de preparação de amostras, mas também pode ser executado individualmente (BICKER et al, 2013), consistindo na desnaturação das proteínas presentes na amostra biológica utilizando um agente precipitante.

Os agentes precipitantes normalmente utilizados são o ácido tricloroacético (TCA), numa proporção entre 1/10 e 1/5, o metanol e o acetonitrilo (ACN), ambos numa proporção de 1/1, e ainda misturas hidroalcoólicas (LÓPEZ, 2009). Relativamente à precipitação de proteínas de amostras contendo Colistina, o agente mais utilizado é o metanol, seguido do TCA, do ACN e do ácido trifluoroacético (TFA) (Tabela 3). A preferência do metanol deve-se ao facto de ser um agente precipitante menos energético que o TCA e, desta forma, não degradar a amostra. Mas por não ser tão energético, pode não desnaturar todas as proteínas e estas ficarem no sobrenadante que, ao ser injetado no sistema de HPLC, promove a degradação da coluna cromatográfica (LÓPEZ, 2009). Uma outra desvantagem inerente ao uso do metanol como agente precipitante é a de poder dissolver a amostra que, em casos em que a concentração de Colistina é baixa, se torna um problema (LÓPEZ, 2009).

4.3.2. Extração em fase sólida

Como é possível observar na Tabela 3, a extração em fase sólida (SPE) é frequentemente utilizada no tratamento de amostras biológicas para a quantificação de Colistina.

É uma técnica que deriva da cromatografia líquida, permitindo a extração de analitos altamente funcionalizados de amostras aquosas e a sua posterior eluição com solventes orgânicos. O procedimento de extração é baseado na adsorção seletiva e na concentração do analito, permitindo assim a sua retenção de forma mais eficiente, seletiva e com recurso a um menor volume de solvente orgânico que a extração líquido-líquido.

A escolha do agente adsorvente, do volume da amostra e do volume e composição das soluções de lavagem e de eluição é importante, de forma a não comprometer a recuperação da Colistina e a *performance* da técnica. O agente adsorvente mais utilizado em amostras biológicas contendo Colistina é o C₁₈ (Tabela 3), sendo também utilizados como agentes adsorventes o C₈, a N-vinilpirrolidona hidrofílica e o divinilbenzeno lipofílico (dois monómeros) e ainda o poliestireno-divinilbenzeno (copolímero) (Tabela 3). Relativamente às soluções de lavagem, existe uma grande variedade aplicada ao tratamento de amostras

biológicas com Colistina dependendo das características do enchimento do cartucho de SPE. Neste contexto, salientam-se como exemplos o tampão carbonato, água, metanol e as misturas de água e metanol, de metanol e ácido fórmico e ainda de água, metanol e ácido fórmico (CHEPYALA et al, 2014; GIKAS et al, 2013; GMUR et al, 2003; GOBIN et al, 2010; IMBERTI et al, 2012; JIN et al, 2009; LI et al, 2001; LI et al, 2002; MERCIER et al, 2014; SORLÍ et al, 2013; THOMAS et al, 2012; XU et al, 2012). A solução de lavagem mais utilizada é a acetona, mas também são utilizadas misturas de ACN, água e TFA, de ácido fórmico e metanol, de ácido fórmico, metanol e água e ainda de acetona, ACN e ácido bórico (CHEPYALA et al, 2014; GIKAS et al, 2013; GMUR et al, 2003; GOBIN et al, 2010; IMBERTI et al, 2012; JIN et al, 2009; LI et al, 2001; LI et al, 2002; MERCIER et al, 2014; SORLÍ et al, 2013; THOMAS et al, 2012; XU et al, 2012).

Apesar da sua ampla aplicação, a SPE é uma técnica morosa, dispendiosa e que promove a falta de reprodutibilidade de *performance* devido à utilização única dos cartuchos, isto é, devido aos cartuchos só poderem ser utilizados uma vez.

4.3.3. Derivatização (deteção por fluorescência)

A derivatização é um procedimento de tratamento de amostras indispensável para a quantificação de Colistina, principalmente quando a deteção é feita por FL (Tabela 3). Isto porque, como referido anteriormente, a Colistina não possui FL nativa e a sua absorvância em UV é baixa (JANSSON et al, 2009; LI et al, 2001). Desta forma, a derivatização permite a transformação química da Colistina em compostos derivados desta, que possuem estrutura e comportamento químicos diferentes, mas que se encontram mais aptos ao processo cromatográfico (LÓPEZ, 2009).

O agente derivatizante mais utilizado na preparação de amostras com Colistina é o cloroformiato de 9-fluorenilmetil (FMOC-Cl) (Tabela 3). De acordo com a literatura contemplada na referida tabela, aquando da adição do FMOC-Cl, é necessário aguardar 10 minutos para que a reação de derivatização se concretize, não havendo a necessidade de esta ocorrer no escuro uma vez que os compostos não são fotossensíveis (CHEPYALA et al, 2015; JIN et al, 2009; LI et al, 2001; LI et al, 2002; SORLÍ et al, 2013). É uma reação rápida e que aumenta a seletividade e sensibilidade da técnica de HPLC (LOZANO et al, 2007), apesar de poder diminuir a reprodutibilidade interlaboratorial (GOBIN et al, 2010). Outros agentes derivatizantes utilizados incluem o cloreto de dansilo, fetalaldeído (OPA) e a reserpina

(Tabela 3). A reação de derivatização com o cloreto de dansilo necessita de uma hora para ocorrer, devendo ocorrer ao abrigo da luz (GMUR et al, 2003).

4.4. Estabilidade e armazenamento

A Colistina é mais estável em amostras plasmáticas do que em amostras sanguíneas (JANSSON et al, 2009).

Quando armazenada a -20°C e é submetida a pelo menos 3 ciclos de congelamento-descongelamento, a Colistina mantém-se estável (CHEPYALA et al, 2015; GIKAS et al, 2013; MERCIER et al, 2014). Também se mantém estável quando armazenada à temperatura ambiente durante 24h (CHEPYALA et al, 2015; GMUR et al, 2003).

Quando as amostras são derivatizadas e armazenadas a 4°C , a Colistina parece ser estável pelo menos durante 24h (CHEPYALA et al, 2015; GMUR et al, 2003).

5. Materiais e Métodos

5.1. Reagentes e compostos

O sulfato de Colistina, o cloridrato de anfetamina, utilizado como PI, e o cloreto de dansilo, utilizado como agente derivatizante, foram adquiridos através da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O metanol e o ACN (ambos grau gradiente para HPLC) foram adquiridos através da Fisher Scientific (Leicestershire, Reino Unido). A água ultrapura (grau gradiente para HPLC; 18,2 MΩ.cm) foi preparada com recurso a um sistema de água MilliQ da Millipore (Milford, MA, EUA).

O TCA, o sulfato de sódio anidro, o bicarbonato de sódio e o carbonato de sódio decahidratado, todos em estado sólido, foram obtidos através da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA), assim como o hidróxido de sódio, utilizado no ajuste do pH do tampão bicarbonato de sódio. O ácido fórmico (98%), o ácido acético glacial (100%) e a acetona extra pura foram adquiridos através da Panreac Química SA (Barcelona, Espanha), da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha) e da Scharlab S. L. (Barcelona, Espanha), respetivamente.

Os brancos de plasma humano foram cedidos pelo Instituto Português de Sangue, após consentimento informado e escrito de indivíduos dadores de sangue.

5.2. Soluções stock, padrões de calibração e padrões de controlo da qualidade

As soluções *stock* de sulfato de Colistina e cloridrato de anfetamina foram preparadas em água ultrapura MilliQ, numa concentração de 1,0 mg/mL. A solução de fármaco foi, posteriormente, diluída com 0,1 M tampão bicarbonato de sódio (pH=8,8) por forma a obter as seis soluções de fortificação de calibração com as concentrações finais de 0,9; 1,8; 3,6; 10,0; 30,0 e 90,0 µg/mL e as quatro soluções de controlo de qualidade (0,9; 2,0; 40,0 e 80,0 µg/mL). Uma solução de calibração de cloridrato de anfetamina, utilizada como PI, foi preparada a 9,0 µg/mL, diluindo apropriadamente a respetiva solução *stock* com 0,1 M tampão bicarbonato de sódio (pH=8,8).

Os padrões de calibração foram preparados a 0,09; 0,18; 0,36; 1,0; 3,0 e 9,0 µg/mL pela adição de 10 µL da respetiva solução de fortificação de calibração a 100µL de plasma humano branco.

Os padrões de controlo da qualidade (CQ) foram preparados de forma independente, em plasma humano, no limite de quantificação (CQ_{LOQ}) e a 3 concentrações diferentes representativas da gama de concentrações esperada: concentrações baixa (CQ_1), média (CQ_2) e alta (CQ_3), por forma a obter as concentrações plasmáticas finais de 0,09; 0,2; 4,0 e 8,0 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente.

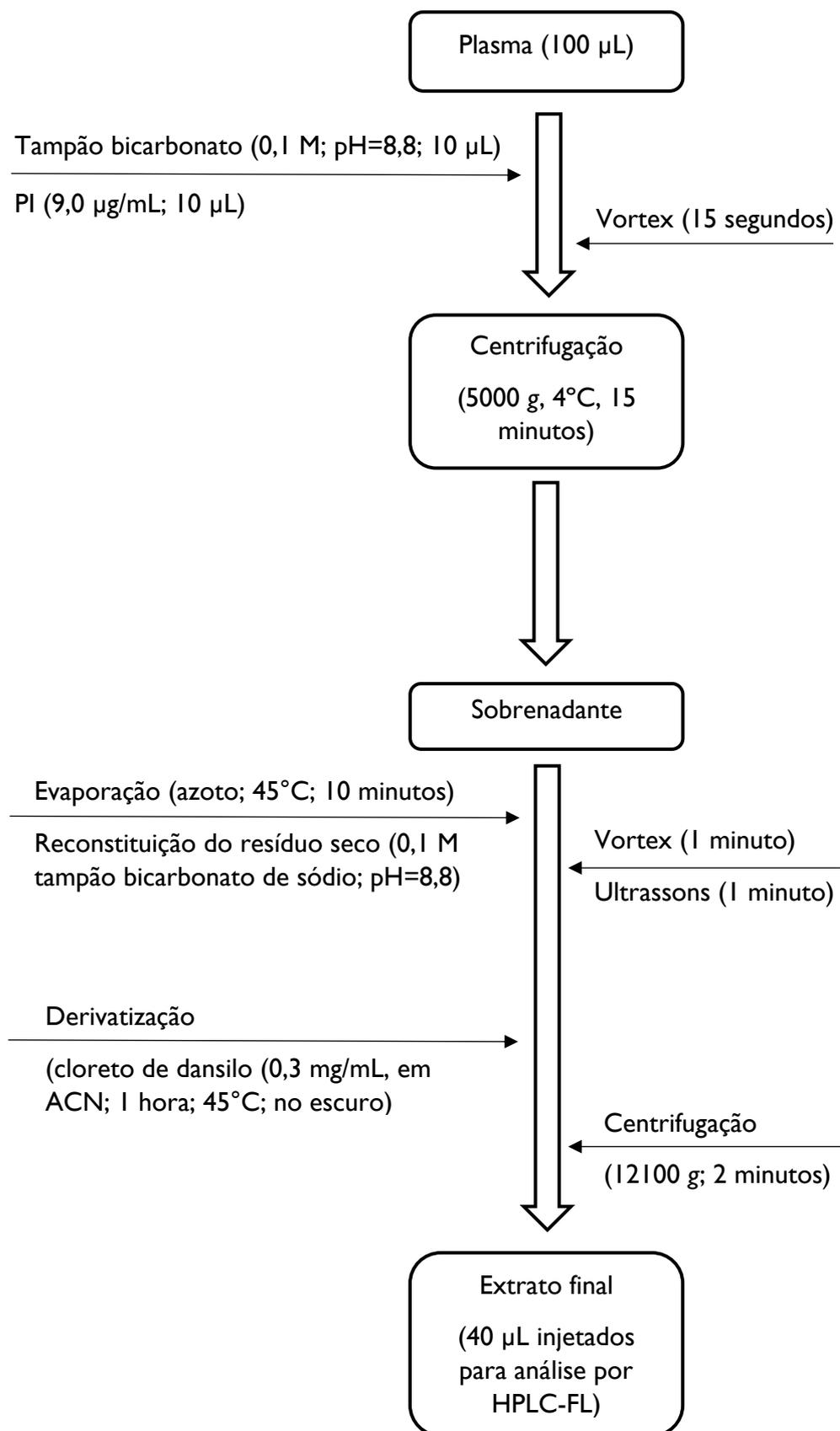
As soluções *stock* e de fortificação foram armazenadas a 4°C e protegidas da luz.

5.3. Preparação e extração das amostras plasmáticas

Após otimização, o processo aplicado para a preparação das amostras plasmáticas para quantificação da Colistina por HPLC-FL consistiu em precipitar as proteínas plasmáticas e submeter posteriormente o resíduo redissolvido a um processo de derivatização com o cloreto de dansilo.

A preparação iniciou-se com a adição de 10 μL de 0,1 M tampão bicarbonato de sódio ($\text{pH}=8,8$) a 100 μL de plasma humano, seguida da adição de 10 μL da solução de fortificação do PI e de 20 μL de 20% TCA. Após agitação no vortex durante 15 segundos, a mistura foi centrifugada a 5000 g a 4°C, durante 15 minutos, por forma a precipitar as proteínas plasmáticas. O sobrenadante resultante foi recolhido e evaporado à secura sob uma corrente ligeira de azoto a 45°C. O resíduo seco obtido foi reconstituído em 100 μL de 0,1 M tampão bicarbonato de sódio ($\text{pH}=8,8$) por agitação no vortex durante 1 minuto e nos ultrassons, durante 1 minuto. O volume total do extrato reconstituído (100 μL) foi, então, submetido a um processo de derivatização com 100 μL de cloreto de dansilo (0,3 mg/mL, em ACN). A mistura foi incubada a 45°C durante 1 hora, ao abrigo da luz. Após a reação de derivatização, a amostra foi centrifugada a 12100 g, durante 2 minutos. Quarenta microlitros de sobrenadante foram injetados no sistema cromatográfico. A Figura 2 esquematiza o processo de preparação e extração das amostras de forma sucinta.

Figura 2 - Esquema da preparação das amostras de plasma humano.



5.4. Sistema de HPLC e condições cromatográficas

As análises cromatográficas apresentadas na presente dissertação para o desenvolvimento, validação e quantificação da Colistina em plasma humano foram realizadas num aparelho de HPLC da marca Shimadzu® (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão), equipado com um sistema de mistura de solventes (LG-20A), um desgaseificador (DGU-20A5), um injetor automático (SIL-20AHI) com um bucle de 10–50 µL, um forno (CTO-10ASVP) para o controlo da temperatura da coluna, um detetor de fluorescência (RF-20AXS) e um detetor de varrimento díodos (SPD-M20A). Para o controlo das condições cromatográficas e o processamento e integração dos dados utilizou-se o *software* LCsolution (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão).

Após otimização, as condições cromatográficas finais aplicadas para separar o fármaco e o PI e quantificar a Colistina em plasma humano incluíram uma coluna C₁₈ LiChroCART® Purospher Star de fase reversa: 55 mm de comprimento, 4 mm de diâmetro interno e 3 µm de tamanho de partícula (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e uma eluição em gradiente que decorreu a 30°C com as características indicadas na Tabela 4. O volume de injeção foi de 40 µL e os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram estabelecidos nos 343 e 500 nm, respetivamente.

Tabela 4 - Programa de eluição por gradiente da fase móvel aplicado ao método de HPLC-FL apresentado nesta dissertação.

Tempo (minutos)	Fase móvel	Fluxo
0-4	ACN: água ultrapura (65: 35, v/v)	0,7 mL/min
4-5	ACN: água ultrapura (90:10, v/v)	1,0 mL/min
5-12		
12-13	ACN: água ultrapura (65:35, v/v)	0,7 mL/min
13-17		

5.5. Validação do método

O método otimizado foi validado de acordo com as *guidelines* internacionais da EMA e da *Food and Drug Administration* (FDA) que descrevem os requisitos exigidos para validar métodos bioanalíticos (EMA, 2012; FDA, 2001). Foi assim elaborada uma validação total do método bioanalítico, uma vez que este foi desenvolvido e implementado pela primeira vez no laboratório, havendo a necessidade de garantir que todos os parâmetros requeridos asseguravam a aceitabilidade do desempenho e da confiabilidade dos resultados analíticos obtidos. Desta forma, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade.

5.5.1. Seletividade

A seletividade do método consiste na capacidade de este diferenciar o analito em estudo dos outros componentes da amostra, como por exemplo componentes endógenos da matriz, metabolitos da Colistina, componentes da decomposição dos produtos da amostra e medicamentos concomitantemente administrados ao doente (EMA, 2012; FDA, 2001). Não implica que o método seja específico para o composto em estudo; implica, sim, que seja capaz de o distinguir inequivocamente de outros componentes, nomeadamente pelo seu tempo de retenção. Significa, assim, que não são detetados picos interferentes nos tempos de retenção do sulfato de Colistina e do PI.

No presente trabalho, a seletividade foi avaliada analisando amostras de plasma branco obtidas de 6 indivíduos diferentes, submetidas ao processo de tratamento das amostras, comparando os cromatogramas resultantes com os obtidos após fortificação das amostras de plasma com o fármaco e com o PI.

5.5.2. Linearidade e limite de quantificação

A linearidade do método cromatográfico foi avaliada na gama de concentrações de 0,09 a 9,0 µg/mL, construindo, em 5 dias diferentes (n=5), curvas de calibração preparadas em brancos de plasma humano, fortificado com seis padrões de calibração com concentrações conhecidas do analito (EMA, 2012; FDA, 2001). As curvas de calibração foram determinadas considerando o quociente entre a área dos picos de Colistina (A+B) e a área do pico do cloridrato de anfetamina (resposta cromatográfica) em função da respetiva concentração do

fármaco. Os dados obtidos foram sujeitos a análise de regressão linear ponderada, usando como fator de ponderação o inverso do quadrado da concentração ($1/x^2$). Foi selecionado este fator de ponderação por melhor se ajustar à razão entre as áreas do fármaco e do PI e a concentração, dado a soma, em valor absoluto, da percentagem do erro relativo apresentar o valor mais baixo.

O limite inferior de quantificação (LLOQ) do método analítico foi definido como a concentração mais baixa da curva de calibração que pode ser determinada com uma precisão (expressa como a percentagem do coeficiente de variação, CV) que não exceda os 20% e uma exatidão (expressa como a percentagem do desvio do valor da concentração nominal, *bias*) compreendida entre os $\pm 20\%$. O LLOQ foi avaliado intra e interdia com recurso a 5 replicados de amostras de plasma ($n=5$) fortificadas com a concentração mais baixa da gama de calibração.

5.5.3. Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão dos resultados foram avaliadas, intra e interdia, em replicado ($n=5$) através das amostras de CQ₁, CQ₂ e CQ₃. Os critérios de aceitação para a precisão e a exatidão foram, respetivamente, um valor de CV menor ou igual a 15% e um valor de *bias* dentro do intervalo $\pm 15\%$.

5.5.4. Recuperação

A recuperação da Colistina e do cloridrato de anfetamina a partir das amostras plasmáticas foi determinada em replicado ($n=5$) nas concentrações dos CQ₁, CQ₂ e CQ₃ e de 9,0 $\mu\text{g/mL}$ para o PI. A recuperação foi estimada comparando as razões entre as áreas dos picos do fármaco em amostras de plasma fortificadas e extraídas nas soluções correspondentes não extraídas (apenas derivatizadas) que correspondem a 100% de recuperação.

5.5.5. Estabilidade em plasma

A estabilidade do sulfato de Colistina em plasma humano foi avaliada em replicado (n=5) recorrendo às amostras de CQ₁ e CQ₃. A estabilidade foi testada após 2 h à temperatura ambiente, 24 h a 4°C e após 30 dias a -20°C, por forma a mimetizar os processos de manipulação, tratamento e armazenamento das amostras pré-análise. A estabilidade foi ainda avaliada nas condições do injetor automático, ou seja, após extração e derivatização, as amostras foram mantidas 24 horas a 4°C.

A estabilidade foi estimada comparando os resultados das amostras analisadas antes (amostras referência) e depois (amostras de estabilidade) da exposição às condições de avaliação da estabilidade. O quociente entre a concentração das amostras de estabilidade e a das amostras referência situado entre os 85 e 115% foram definidos, de acordo com as *guidelines*, como critério de estabilidade.

5.6. Aplicação do método a amostras clínicas

Para a aplicação do método desenvolvido a casos reais, foram analisadas 13 amostras clínicas de 10 doentes. As referidas amostras foram submetidas ao processo de tratamento mencionado na secção 5.3. e submetidas a análise por HPLC-FL de acordo com as condições cromatográficas especificadas na secção 5.4..

As vias de administração e posologia aplicadas são apresentadas na Tabela 5, bem como o período de tempo decorrido entre a administração do CMS e a colheita de sangue. Com o intuito de salvaguardar a anonimidade dos doentes, estes serão referidos como números que não correspondem à realidade.

Tabela 5 - Vias de administração, posologia e tempo decorrido entre a administração do CMS e a colheita de sangue.

Doente	Via de administração	Posologia	Período de tempo entre a administração do CMS e a colheita de sangue
1	IV	1 MIU (24 em 24 horas)	22h 40 minutos
	IV	1 MIU (24 em 24 horas)	22h 40 minutos
2	IV	2 MIU (8 em 8 horas)	7h 50 minutos
3	IV / inalatória	2 MIU / 1 MIU (8 em 8 horas, ambas)	9h 40 minutos (ambas)
	IV / inalatória	3 MIU / 1 MIU (12 em 12 horas / 8 em 8 horas)	13h 40 minutos / 9h 40 minutos
4	IV	2 MIU (8 em 8 horas)	6h 30 minutos
	inalatória	1 MIU (8 em 8 horas)	9h 45 minutos
5	IV	4,5 MIU (12 em 12 horas)	12h 30 minutos
6	IV	1 MIU (12 em 12 horas)	10h 15 minutos
7	IV	1 MIU (8 em 8 horas)	12h 30 minutos
8	IV	1 MIU (8 em 8 horas)	7h 15 minutos
9	IV	1 MIU (8 em 8 horas)	7h 10 minutos
10	-	-	-

6. Resultados

6.1. Desenvolvimento do método

6.1.1. Detecção por DAD

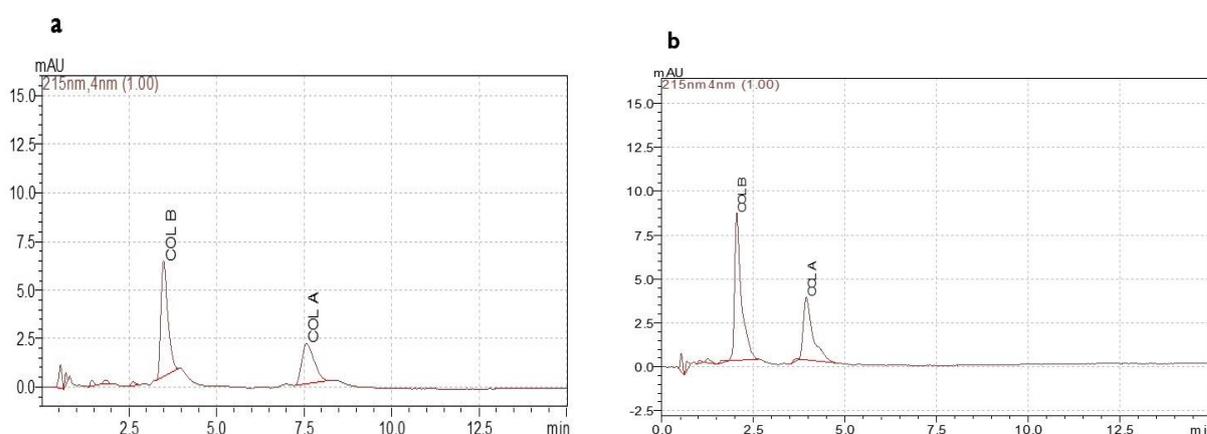
Apesar de a maioria das técnicas de HPLC para quantificação da Colistina recorrer a detetores de FL ou de MS (Tabela 3), optou-se por iniciar o desenvolvimento do presente método utilizando o DAD que, não necessitando de um processo de derivatização, permite obter um método mais rápido e fácil, bem como um maior conhecimento sobre o fármaco. Assim, com base no método publicado por LOSANO et al, 2007, tentou-se eluir a Colistina de uma coluna C₁₈ LiChroCART® Purospher Star de fase reversa aplicando diferentes composições de fase móvel, eluídas a um fluxo de 1 mL/min e constituídas por uma fase aquosa de tampão sulfato de sódio anidro (pH=5,7) (Tabela 6). Os cromatogramas obtidos com as fases móveis 3 e 4 da Tabela 6 apresentam-se na Figura 3.

Tabela 6 - Fases móveis testadas para a deteção por DAD.

Fase móvel	Tempo retenção da Colistina (minutos)	
	Colistina A	Colistina B
1. Tampão sulfato de sódio anidro: ACN (75: 25, v/v)	1,46	0,96
2. Tampão sulfato de sódio anidro: ACN (50: 50, v/v)	4,91	0,95
3. Tampão sulfato de sódio anidro: ACN: MeOH (75: 20: 5, v/v/v)	7,57	3,50

4. Tampão sulfato de sódio anidro: ACN: MeOH (73: 22: 5, v/v/v)	3,94	2,04
--	-------------	-------------

Figura 3 - Cromatogramas obtidos através da detecção por DAD de soluções diretas de Colistina eluídas com as fases móveis 3 e 4 (a e b, respetivamente).



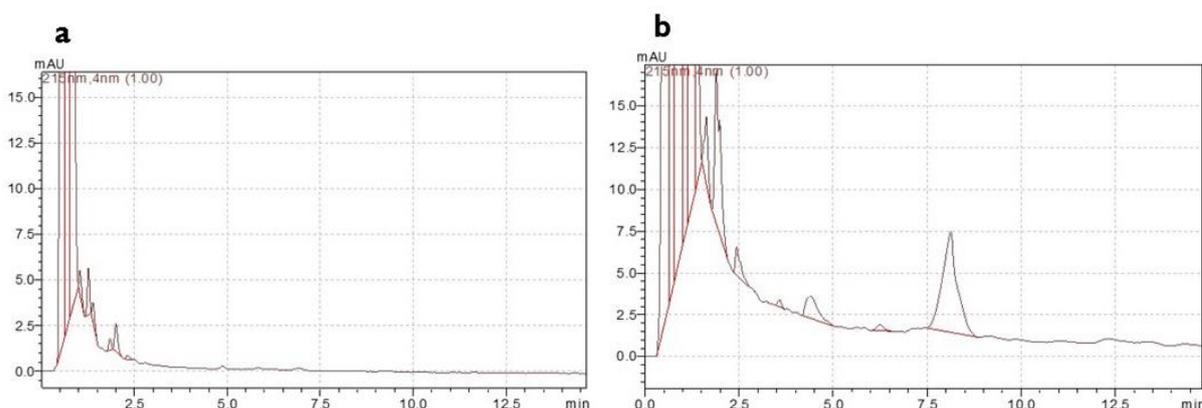
Com a fase móvel constituída por tampão sulfato de sódio anidro, ACN e metanol, nas proporções de 73%, 22% e 5%, respetivamente, foram testadas diversas concentrações de Colistina (0,5; 5,0 e 50,0 µg/mL), no entanto para concentrações inferiores a 5 µg/mL não foi possível a deteção dos analitos.

Assim sendo, e na tentativa de concentrar a amostra após extração do fármaco das amostras de plasma, procedeu-se à fortificação do plasma com Colistina (50,0 µg/mL) e submeteram-se as amostras a um processo de SPE, utilizando cartuchos OASIS HLB® (30 mg/L; Waters, Milford, MA, EUA), que se encontra sumariado na Tabela 7. Os brancos de plasma humano apresentaram interferentes no tempo de retenção da Colistina (Figura 4), em quantidades bastante superiores à margem terapêutica e a outras gamas de calibração descritas na literatura, 0,1- 8,0 µg/mL (CHEPYALA et al, 2015; SORLÍ et al, 2013), para a Colistina, limitando a aplicação deste tipo de deteção.

Tabela 7 - Processo de extração e concentração da Colistina por SPE.

SPE	Acondicionamento	Lavagem	Eluição	Resultados
Condições 1	metanol e água ultrapura	metanol	0,1% ácido fórmico em metanol	O metanol é o melhor solvente de lavagem, pois permite obter cromatogramas com menos interferentes e menor tempo de retenção da Colistina
Condições 2		água ultrapura		

Figura 4 - Cromatogramas de amostras plasmáticas brancas após extração por SPE nas condições 1 e 2 (a e b, respectivamente), eluídas com a fase móvel de tampão sulfato de sódio anidro: ACN: metanol (73: 22: 5, v/v/v).



6.1.2. Derivatização para detecção por fluorescência

Após descartar a detecção por DAD, optou-se pela detecção por FL. O primeiro desafio encontrado centrou-se no processo de derivatização das amostras com o cloreto de dansilo.

A fase móvel inicialmente testada teve por base o trabalho publicado por GMUR et al, 2010 (Tabela 2), sendo esta constituída por 0,2% ácido acético glacial em água ultrapura e metanol, nas proporções de 70% e 30%, respectivamente, e eluída a um fluxo de 0,8 mL/min. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram 344 e 518 nm, respectivamente. Foram injetadas soluções aquosas do fármaco (1,0 mg/mL, em água ultrapura), após 1 hora de reação de derivatização com cloreto de dansilo (0,5 mg/mL, em ACN), à temperatura

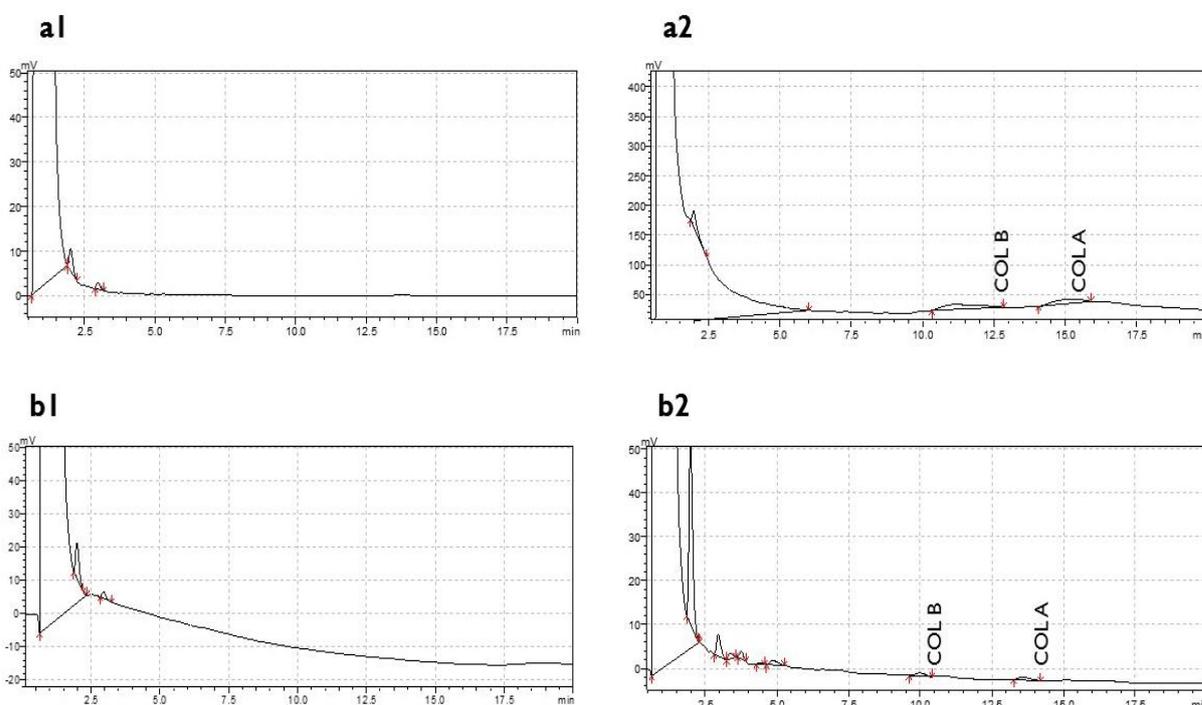
ambiente no escuro. Não foram obtidas diferenças entre os cromatogramas das soluções contendo apenas o agente derivatizante e os das soluções com a Colistina derivatizada. Assim sendo, foram testadas diferentes concentrações de fármaco (25 - 250 µg/mL) e temperaturas da reação de derivatização (temperatura ambiente e 45°C). Todavia, os resultados foram similares independentemente de as amostras conterem ou não Colistina. Desta forma, a concentração do cloreto de dansilo foi testada, variando-a entre 0,3 e 1,0 mg/mL, por forma a avaliar-se a possível saturação e/ou sobreposição dos picos dos analitos derivatizados com o agente de derivatização, bem como a existência de cloreto de dansilo em quantidade suficiente para reagir com o analito. No entanto, não foram observadas diferenças nos resultados obtidos.

Face aos resultados obtidos, a fase móvel foi alterada para 70% de metanol e 30% de 0,2% ácido acético glacial em água ultrapura e a componente cromatográfica *response* foi alterada de 1s para 3s, tal como descrito por FUH et al, 2002, mas não houve registo de picos que indicassem ser da Colistina. Como estes resultados não sofreram alterações quando comparados com os obtidos até ao momento, optou-se pela avaliação do efeito do pH do tampão bicarbonato de sódio, utilizado na preparação das soluções de fortificação.

Por conseguinte, foi preparada uma solução de fármaco na concentração de 250 µg/mL, em 0,1 M tampão bicarbonato de sódio, pH=8,8, após ajuste do mesmo com 2,0 M hidróxido de sódio. Promoveu-se a reação de derivatização entre a referida solução de fármaco e o agente derivatizante, na concentração de 0,5 mg/mL, dissolvido em ACN ou em acetona, durante 1 hora e uma hora e meia a 45°C. Nos cromatogramas das soluções contendo Colistina foi possível a distinção de dois picos: um referente à Colistina A e outro referente à Colistina B, picos esses que não existiam nos cromatogramas das soluções sem Colistina. Não tendo sido observadas diferenças nos resultados obtidos com o cloreto de dansilo dissolvido em ACN ou em acetona, optou-se pela dissolução do agente derivatizante em ACN, uma vez que este se encontra mais frequentemente indicado na literatura.

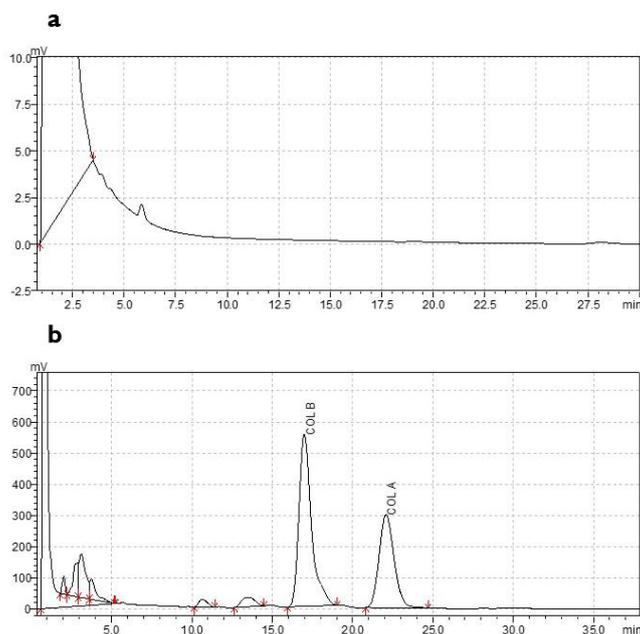
Motivados pelos resultados obtidos, não obstante as reduzidas área e altura dos picos obtidos, provavelmente pela fraca resolução dos mesmos, isto é, muito largos e baixos, diminuiu-se a concentração do agente de derivatização para 0,15 e 0,3 mg/mL. As soluções foram eluídas com a fase móvel metanol: 0,2% ácido acético glacial em água ultrapura (70: 30, v/v), e os resultados obtidos encontram-se na Figura 5.

Figura 5 – Cromatogramas obtidos das soluções brancas e fortificadas com Colistina (250 µg/mL) após derivatização com cloreto de dansilo na concentração de 0,15 mg/mL (**a1** e **a2**, respectivamente) e na concentração de 0,30 mg/mL (**b1** e **b2**, respectivamente).



É possível verificar que as reações de derivatização com o cloreto de dansilo na concentração menor (0,15 mg/mL) possuem mais ruído, de tal forma, que existiu a necessidade de apresentar o cromatograma referente à amostra fortificada numa escala maior (Figura 5). É, também, evidente que os picos da Colistina A e B após derivatização com cloreto de dansilo na concentração de 0,15 mg/mL possuem uma largura mais ampla, quando comparados com os obtidos com o agente derivatizante na concentração de 0,3 mg/mL. Desta forma, a concentração de 0,3 mg/mL do agente derivatizante foi selecionada para os estudos seguintes. Com o intuito de obter uma melhor resolução e simetria dos picos, a fase móvel foi alterada para metanol: 0,2% ácido acético glacial em água ultrapura (85: 15, v/v), bem como o fluxo ao qual foi eluída (0,8 mL/min), no entanto a temperatura do forno foi mantida (30°C). Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.

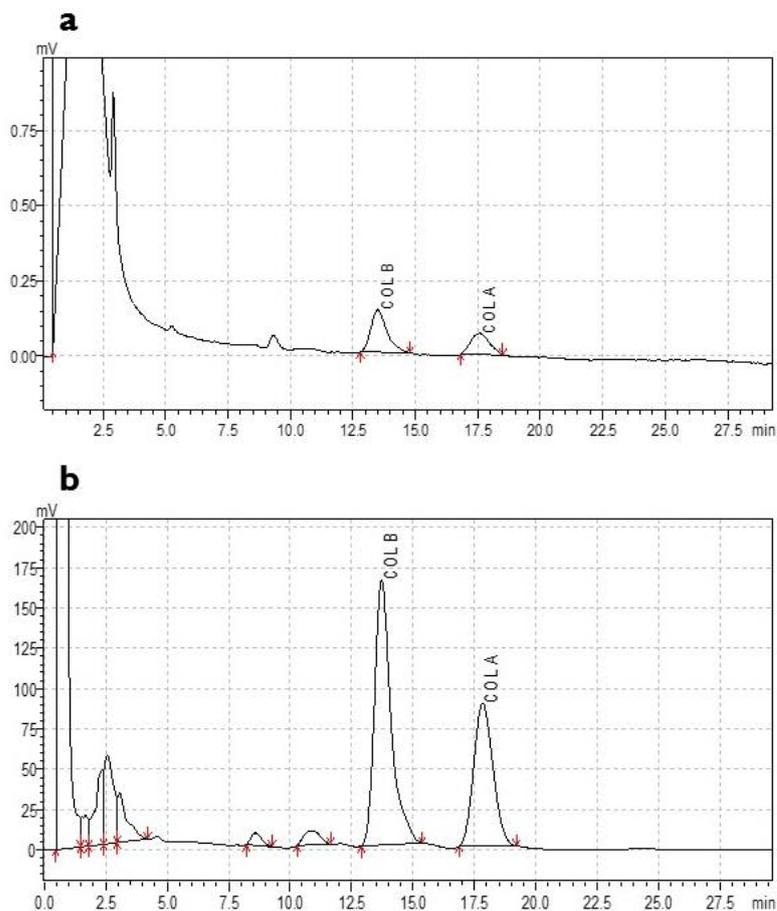
Figura 6 – Cromatogramas obtidos das soluções brancas e fortificadas com Colistina (50 µg/mL), após eluição com 85% metanol e 15% 0,2% ácido acético glacial em água ultrapura (**a** e **b**, respectivamente).



Através da Figura 6, é possível observar uma melhoria na resolução e na simetria dos picos da Colistina A e B, bem como um aumento substancial das suas áreas. Contudo, os tempos de retenção obtidos foram tardios, 16,99 e 22,08 minutos para a Colistina B e A, respectivamente. Desta forma, estudou-se a possibilidade dos analitos serem eluídos a menores tempos de retenção.

Para a otimização dos tempos de retenção da Colistina A e B, foi adicionada uma pequena percentagem de ACN à fase móvel, obtendo-se uma fase móvel constituída por 80% de metanol, 15% de 0,2% ácido acético glacial em água ultrapura e 5% de ACN. Os resultados foram semelhantes aos anteriores e, conseqüentemente, a fase móvel foi mantida com as percentagens em metanol e 0,2% ácido acético glacial em água ultrapura anteriores (85: 15, v/v). Assim, o fluxo foi aumentado para 1,0 mL/min. Nestas condições, foi possível a diminuição dos tempos de retenção da Colistina A e B para 13,73 e 17,84 minutos, respectivamente, bem como a sua quantificação na concentração de 0,125 µg/mL (Figura 7).

Figura 7 – Cromatogramas obtidos das soluções diretas de Colistina nas concentrações de 0,125 µg/mL (**a**) e de 25 µg/mL (**b**), após eluição com metanol: 0,2% ácido acético glacial em água ultrapura (85: 15, v/v; 1,0 mL/min).

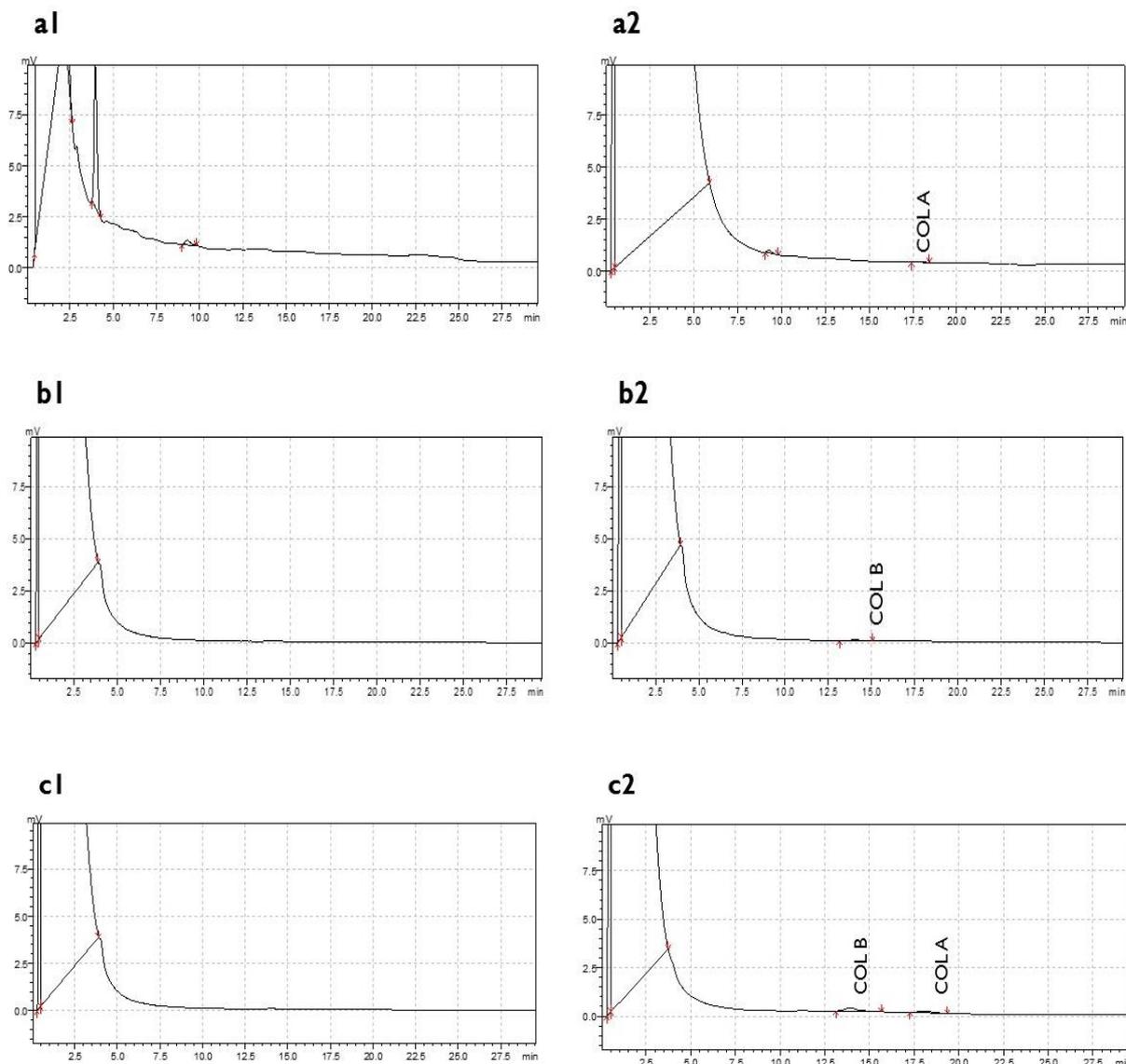


De modo a utilizar-se uma fase móvel mais económica e rápida, testou-se a influência da substituição do 0,2% ácido acético glacial em água ultrapura por água ultrapura. Como não foram observadas alterações significativas, a fase móvel foi alterada para metanol e água (85: 15, v/v), evitando a lavagem diária da coluna exigida aquando da utilização de tampões, por forma a que os sais dos mesmos não precipitem no sistema de HPLC e/ou na coluna cromatográfica, promovendo a detioração de ambos.

6.1.3. Preparação e extração das amostras plasmáticas

Motivados pelos resultados obtidos e com o objetivo de otimizar um processo rápido e fácil de extração do fármaco a partir de amostras de plasma humano, as amostras de plasma foram submetidas a um processo simples de precipitação das proteínas plasmáticas. Como agente precipitante, testou-se o ACN, uma mistura de 20% TCA e metanol (50: 50, v/v) e apenas 20% TCA. Após a adição de cada um dos agentes de precipitação ao plasma branco e fortificado com Colistina a 60 µg/mL, as misturas foram centrifugadas a 1000 g e 4°C, durante 15 minutos, e o sobrenadante resultante foi recolhido e evaporado sob uma corrente ligeira de azoto a 45°C e, posteriormente, reconstituído em 0,1 M tampão bicarbonato de sódio (pH=8,8), e submetido ao processo de derivatização previamente descrito na secção 6.1.2.. No entanto, aquando da adição do agente derivatizante as amostras turvaram, indicando a existência de proteínas que não precipitaram após a adição do agente de precipitação (ACN). Desta forma, as amostras foram novamente centrifugadas (12100 g durante 2 minutos) para que pudessem ser injetadas no sistema de HPLC sem promoverem o deterioramento do mesmo nem da coluna cromatográfica. Além das amostras fortificadas com Colistina (60 µg/mL), também foram preparadas amostras de plasma branco ao qual apenas era adicionado o agente precipitante, por forma a ser testada a influência dos mesmos nos picos da Colistina. Os resultados obtidos após a injeção das amostras submetidas a precipitação proteica com ACN, com a mistura e com 20% TCA encontram-se na Figura 8.

Figura 8 - Cromatogramas das amostras plasmáticas brancas e fortificadas com Colistina após precipitação proteica com ACN (**a1** e **a2**, respectivamente), com a mistura metanol: 20% TCA (50:50, v/v) (**b1** e **b2**, respectivamente) e com 20% TCA (**c1** e **c2**, respectivamente).



Face aos resultados obtidos (Figura 8), testou-se a variação do volume de plasma (100, 200 e 300 μL) para a precipitação proteica com a mistura de 20% TCA: metanol (50: 50, v/v), bem como o aumento da força gravítica da centrifugação após a adição do agente precipitante para os 5000 g. Para cada volume foram preparadas duas amostras: uma branca e uma fortificada, às quais foi adicionado o mesmo volume de agente precipitante (10 μL). No entanto, para os volumes de 200 e 300 μL , aquando da adição do agente derivatizante, ocorreu precipitação de proteínas. Desta forma, o volume de amostra plasmática foi estabelecido para os 100 μL e o agente precipitante escolhido para continuar com os estudos foi o 20% TCA.

6.1.4. Seleção do padrão interno

Após otimização do processo de tratamento das amostras, houve a necessidade de selecionar um PI que se adequasse ao processo de tratamento das amostras bem como às condições cromatográficas aplicadas a estas.

O PI escolhido para a otimização, validação e aplicação do método apresentado nesta dissertação foi o cloridrato de anfetamina. Desta forma, foram analisadas soluções diretas de PI, na concentração de 500 µg/mL, após derivatização com cloreto de dansilo. No entanto, com estas condições, não foi possível identificar o pico que pudesse corresponder ao PI. Conseqüentemente foram estudadas várias concentrações de PI. Porém, não foram verificadas diferenças nos cromatogramas com ou sem o PI e, desta forma, houve a necessidade de se alterar a fase móvel previamente utilizada, 85% metanol e 15% água ultrapura, para uma fase móvel constituída por 65% ACN e 35% água ultrapura e eluída a um fluxo de 0,4 mL/min. Para a nova fase móvel foram analisadas soluções diretas de PI, nas concentrações de 25 e 250 µg/mL, por forma a avaliar-se a possível saturação do PI derivatizado com o agente de derivatização, bem como a existência de cloreto de dansilo em quantidade suficiente para reagir com o PI, tal como avaliado para a Colistina. Contudo, não foram obtidas alterações nos resultados quando comparados com os obtidos previamente e, conseqüentemente, o fluxo da fase móvel foi aumentado para 0,7 mL/min e foram analisadas soluções diretas de PI e de Colistina (0,25 e 25,0 µg/mL, respetivamente), após reação de derivatização com cloreto de dansilo. Porém, com estas condições cromatográficas, ocorreu a antecipação dos tempos de retenção da Colistina e, conseqüentemente, a sobreposição dos picos desta com o do PI.

Tendo em conta os resultados obtidos, a opção mais viável para a otimização do método de forma a que permitisse a quantificação simultânea do cloridrato de anfetamina e do sulfato de Colistina, isto é, a quantificação de ambos os compostos num curto período de tempo e sem sobreposição de picos, consistiu em testar a eluição da fase móvel por gradiente. A Tabela 8 resume os diversos programas de eluição da fase móvel por gradiente estudados e respetivos resultados obtidos.

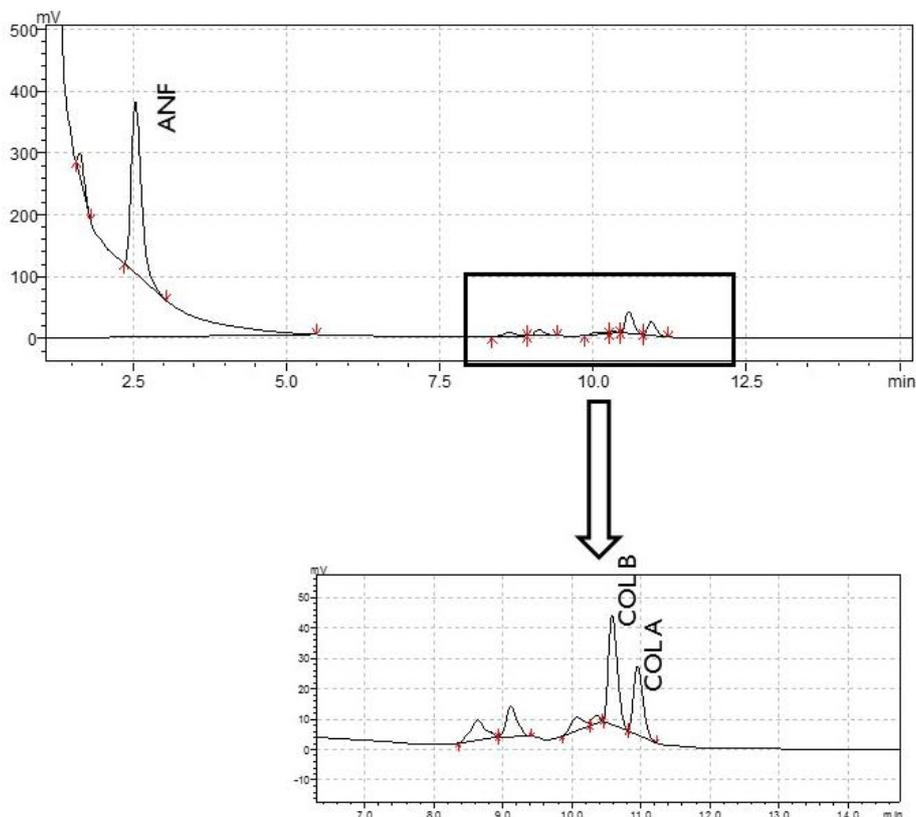
Tabela 8 - Programas de eluição da fase móvel por gradiente estudados na presente dissertação.

Tempo (minutos)	Fase móvel	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (minutos)
Primeiro programa de eluição por gradiente testado			
0-5	ACN: água ultrapura (65: 35, v/v)	0,7	Colistina A = 18,07 Colistina B = 16,91 PI = 2,72
5-8	ACN: água ultrapura		
8-28	(85: 25, v/v)		
28-29	ACN: água ultrapura		
29-33	(65: 35, v/v)		
Segundo programa de eluição por gradiente testado			
0-5	ACN: água ultrapura (65: 35, v/v)	0,7	Colistina A = 14,93 Colistina B = 14,10 PI não analisado
5-8	ACN: água ultrapura	1,0	
8-15	(85: 25, v/v)		
15-16	ACN: água ultrapura	0,7	
16-20	(65: 35, v/v)		
Terceiro programa de eluição por gradiente testado			
0-4	ACN: água ultrapura (65:35, v/v)	0,7	Colistina A = 12,68 Colistina B = 11,87 PI = 2,77
4-5	ACN: água ultrapura	1,0	
5-14	(85: 25, v/v)		
14-15	ACN: água ultrapura	0,7	
15-19	(65: 35, v/v)		
Quarto programa de eluição por gradiente estudado			
0-4	ACN: água ultrapura (65: 35, v/v)	0,7	Colistina A = 11,07 Colistina B = 10,68 PI= 2,51
4-5	ACN: água ultrapura	1,0	
5-14	(90: 10, v/v)		
14-15	ACN: água ultrapura	0,7	
15-19	(65: 35, v/v)		

Quinto programa de eluição por gradiente estudado			
0-4	ACN: água ultrapura (65: 35, v/v)	0,7	Colistina A = 10,72 Colistina B = 10,32 PI = 1,39
4-5	ACN: água ultrapura (90: 10, v/v)	1,0	
5-12			
12-13	ACN: água ultrapura (65: 35, v/v)	0,7	
13-16			
Sexto programa de eluição por gradiente estudado			
0-4	ACN: água ultrapura (65: 35, v/v)	0,7	Colistina A = 10,96 Colistina B = 10,58 PI = 2,66
4-5	ACN: água ultrapura (90: 10, v/v)	1,0	
5-12			
12-13	ACN: água ultrapura (65: 35, v/v)	0,7	
13-17			

O sexto programa de eluição por gradiente estudado foi selecionado, uma vez que permitia a separação cromatográfica da Colistina A e B e do PI num menor período de tempo (Figura 9).

Figura 9 – Cromatograma obtido da solução direta derivatizada contendo Colistina e PI, ambos na concentração de 18 µg/mL, após eluição com o sexto programa de gradiente.



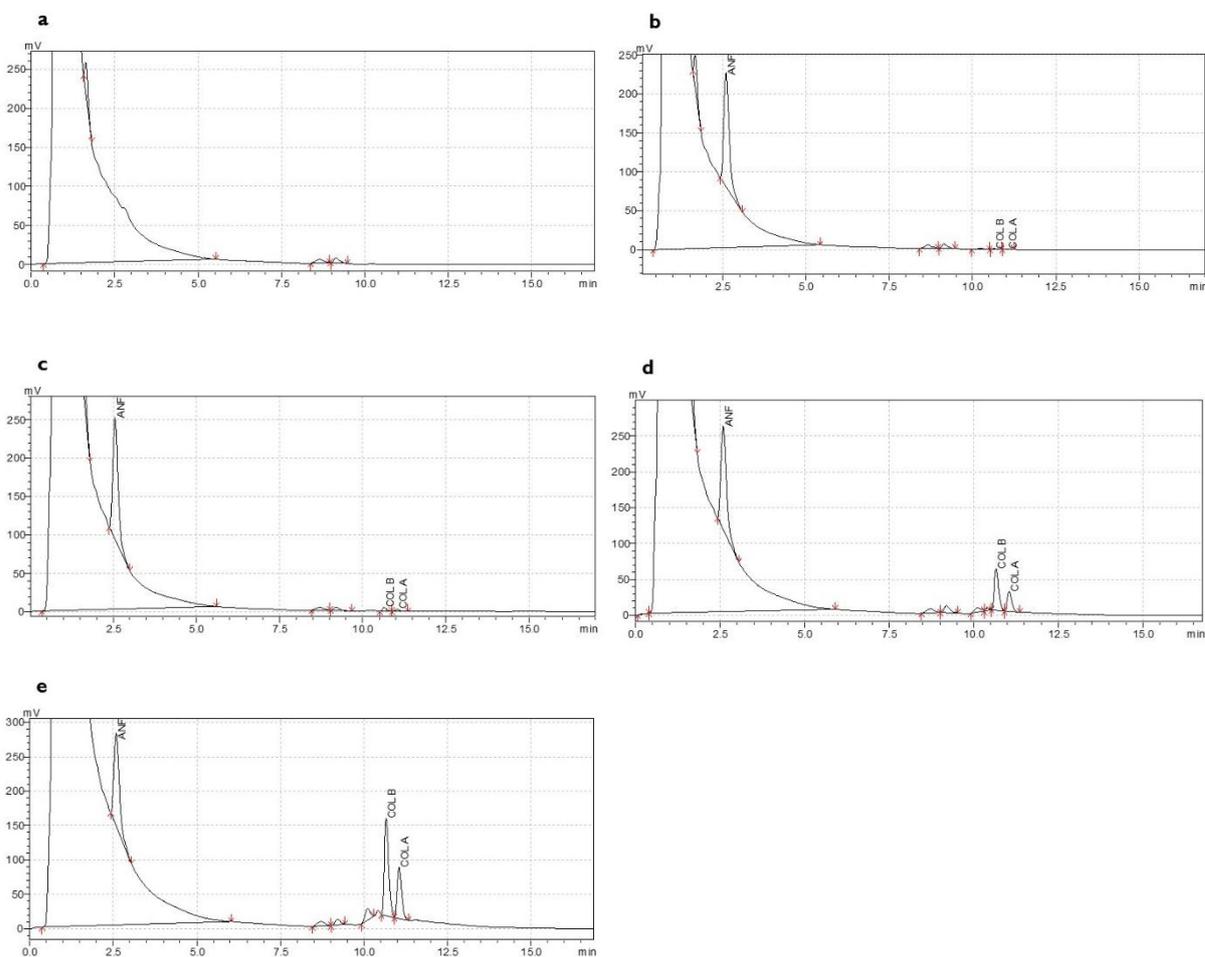
6.2. Validação do método

6.2.1. Separação cromatográfica e seletividade

O método de HPLC-FL desenvolvido e aqui apresentado permitiu, com sucesso, a separação cromatográfica do sulfato de Colistina e do PI em amostras de plasma humano, recorrendo ao processo de preparação de amostras e às condições cromatográficas anteriormente descritas nas secções 5.3. e 5.4., respetivamente. Desta forma, e tendo em consideração as condições cromatográficas expressas na secção 5.4., a ordem de eluição dos analitos foi a seguinte: PI, Colistina B e Colistina A (Figura 10).

Após o processo de tratamento e análise por HPLC-FL de amostras de plasma branco de 6 indivíduos diferentes, não foram observados picos interferentes ao tempo retenção dos analitos (Figura 10).

Figura 10 - Cromatogramas representativos de extratos de plasma branco (a); plasma fortificado com PI (9,0 µg/mL) e sulfato de Colistina (0,9 µg/mL) (b); plasma fortificado com PI (9,0 µg/mL) e sulfato de Colistina (2,0 µg/mL) (c); plasma fortificado com PI (9,0 µg/mL) e sulfato de Colistina (40,0 µg/mL) (d); plasma fortificado com PI (9,0 µg/mL) e sulfato de Colistina (80,0 µg/mL) (e).



6.2.2. Linearidade e limite de quantificação

A linearidade do método na gama de concentrações de 0,09-9,0 µg/mL foi demonstrada para a Colistina total, resultante do somatório das áreas dos picos da Colistina A e B, em plasma humano ($r^2 = 0,993$). A equação de regressão da curva de calibração obtida foi $y = 0,1055x - 0,0016$, onde o y representa o quociente entre o somatório das áreas dos picos da Colistina A e B e a área do pico do PI, e o x representa a concentração teórica de Colistina total, expressa em µg/mL de plasma. O LLOQ do método apresentado foi estabelecido como sendo 0,09 µg/mL.

6.2.3. Precisão e exatidão

Os dados de precisão e exatidão intra e interdia do método, obtidos da análise de amostras CQ em plasma humano, incluindo o LLOQ, encontram-se apresentados na Tabela 9. Na generalidade dos resultados intra e interdia obtidos, o valor mínimo do CV atingido foi de 13,85% e o valor de *bias* variou entre os -3,83 e 14,49%.

Tabela 9 - Precisão (% CV) e exatidão (% *bias*) para a determinação da Colistina A e B em amostras de plasma humano no LOQ e nas concentrações baixa, média e alta da gama de concentrações, com um n=5.

Concentração nominal (µg/mL)	Intradia			Interdia		
	Concentração experimental (µg/mL)	% CV	% <i>bias</i>	Concentração experimental (µg/mL)	% CV	% <i>bias</i>
0,09	0,096±0,007	7,32	6,40	0,084±0,001	12,67	4,83
0,2	0,186±0,009	4,90	-3,83	0,186±0,02	12,81	-6,82
4,0	4,304±0,54	12,50	2,37	4,697±0,46	9,87	11,69
8,0	8,203±1,14	13,85	-2,62	9,647±1,15	11,96	14,49

6.2.4. Recuperação

A recuperação da Colistina total a partir de plasma humano foi calculada e os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Recuperação da Colistina total em plasma humano.

Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Número de amostras	Recuperação	
		Média (%)	% CV
Plasma		Colistina total	
0,2	5	65,24 \pm 9,84	15,09
4,0	5	55,01 \pm 9,82	17,84
8,0	5	55,35 \pm 7,53	13,60

6.2.5. Estabilidade em plasma

A estabilidade do sulfato de Colistina em plasma humano foi estudada nas condições descritas na secção 5.5.5.. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Estabilidade do sulfato de Colistina em plasma humano, após aplicação do processo de tratamento otimizado.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	0,2	8,0
Condições de estabilidade	Concentração de estabilidade / Concentração referência do analito (%)	
Plasma		
Temperatura ambiente (2 horas)	97,9	88,2
4°C (24 horas)	98,5	91,7
-24°C (30 dias)	85,0	105,06
Amostras plasmáticas pós-tratamento (no injetor automático)		
4°C (24 horas)	111,1	95,5

6.3. Aplicação do método a amostras clínicas

As amostras clínicas foram obtidas de 10 doentes, dos quais 6 eram do sexo masculino e 4 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 38 e os 81 anos. A um dos doentes não era administrado CMS, no entanto todos eles eram polimedicados, com uma média de 19 (11-31) fármacos concomitantemente administrados com o CMS (Figura 11).

A equação de regressão da curva de calibração utilizada para a análise das amostras clínicas foi $y = 0,1055x - 0,0016$ ($r^2 = 0,993$), a equação de regressão utilizada na validação do método, onde y representa o quociente entre o somatório das áreas dos picos da Colistina A e B e a área do pico do PI, e o x representa a concentração teórica de Colistina total, expressa em $\mu\text{g/mL}$ de plasma, tal como referido na secção 6.2.2..

Os resultados obtidos da análise da quantificação das amostras clínicas, bem como os valores de CrS e o serviço de internamento dos doentes, encontram-se na Tabela 12 e os respetivos cromatogramas na Figura 12. Na Figura 12 existem dois cromatogramas dos doentes 1, 3 e 4 uma vez que foram fornecidas duas amostras plasmáticas de cada referido doente.

Figura 11 - Fármacos concomitantemente administrados com CMS aos doentes internados no CHUC.

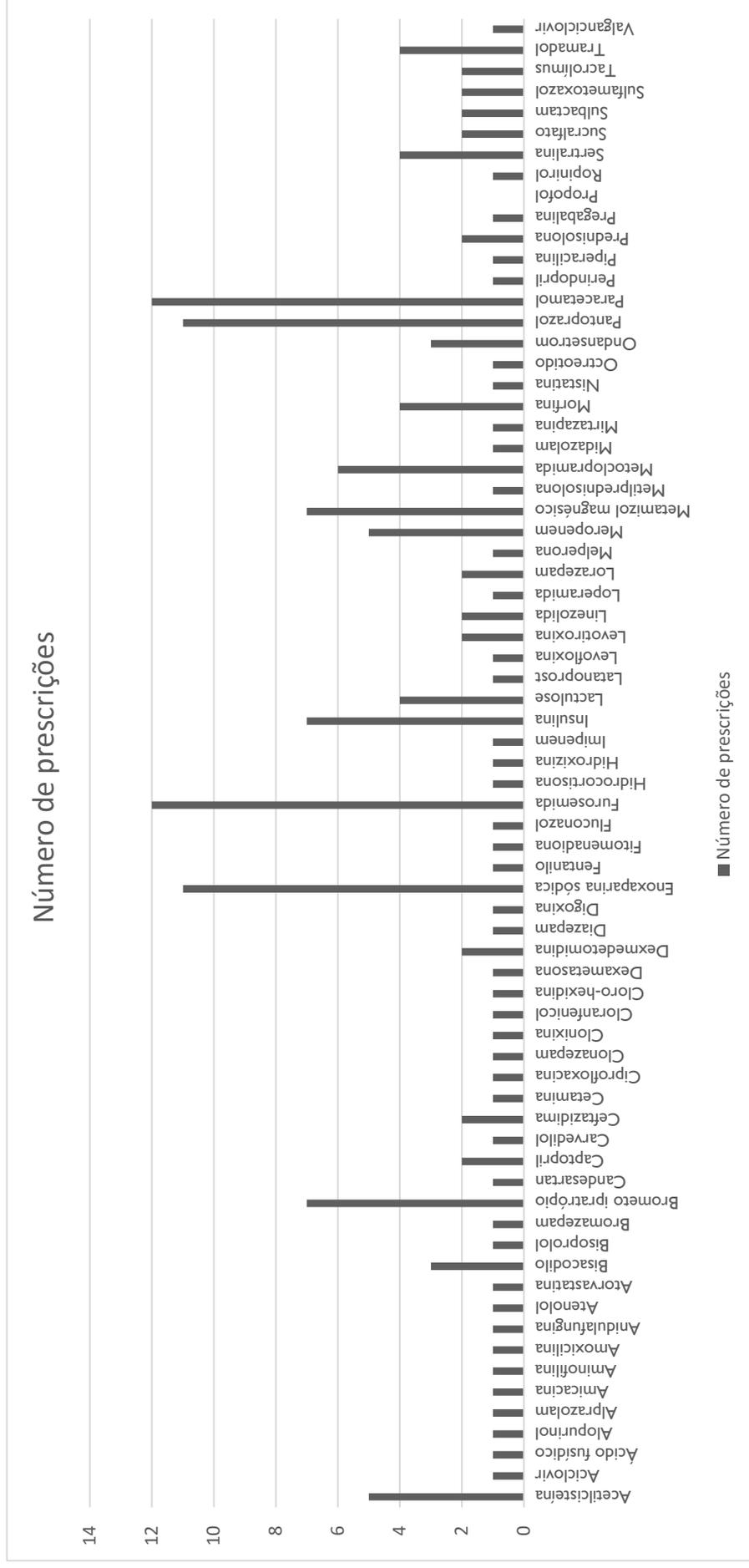
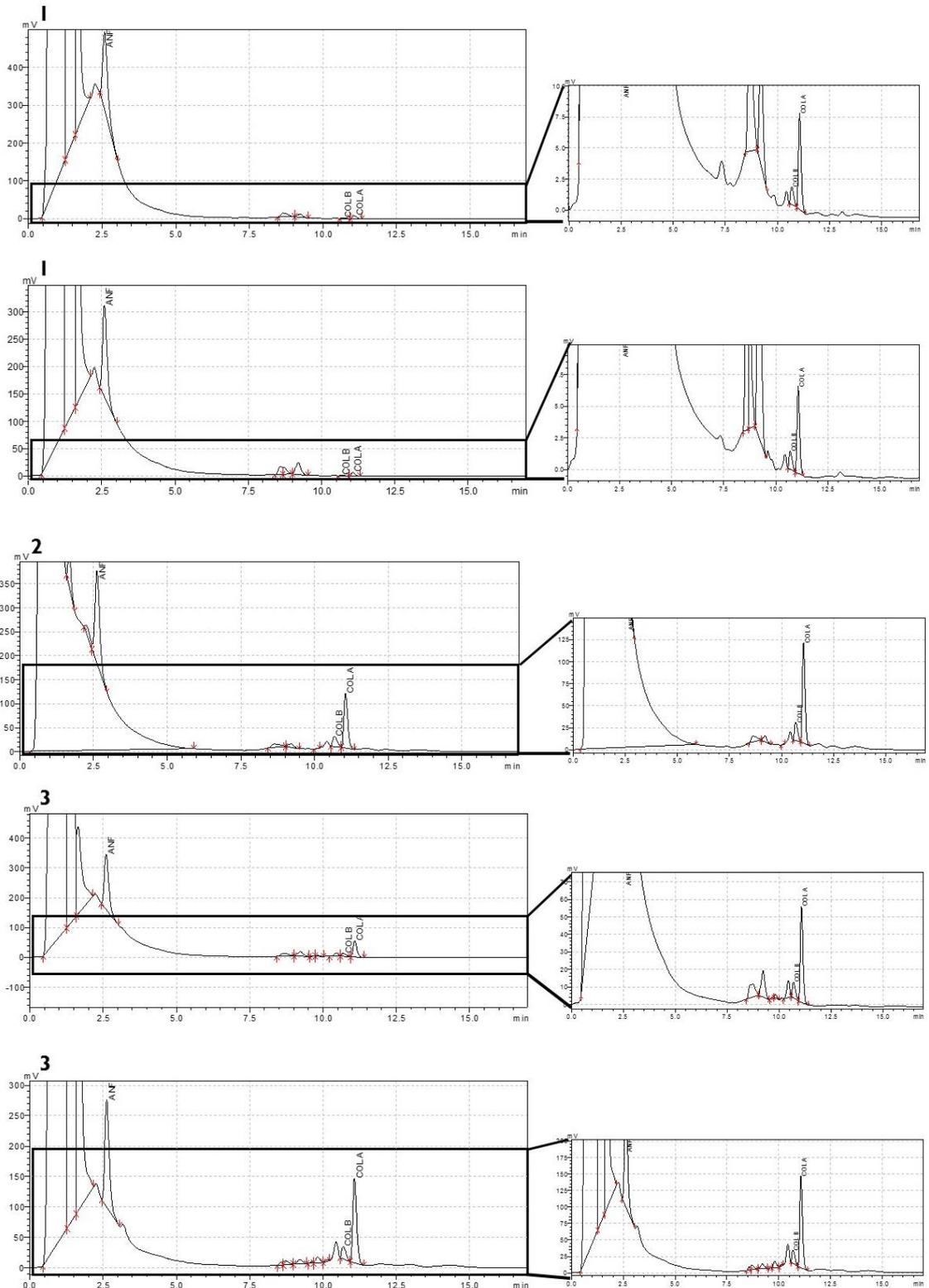
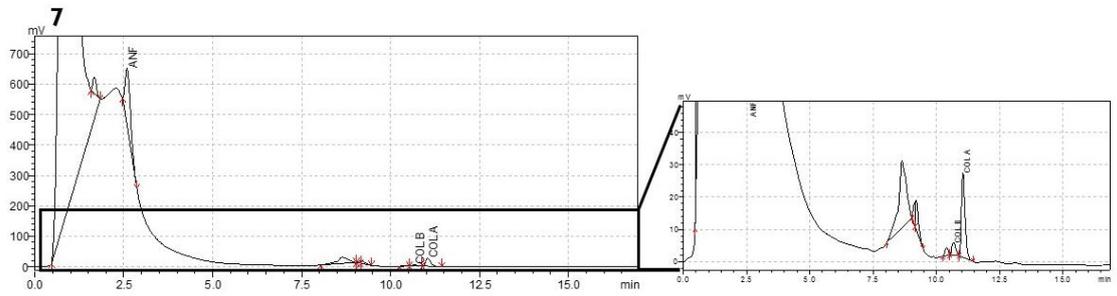
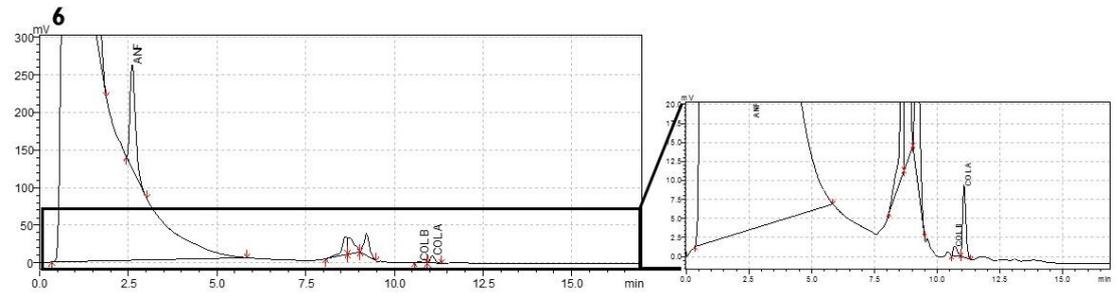
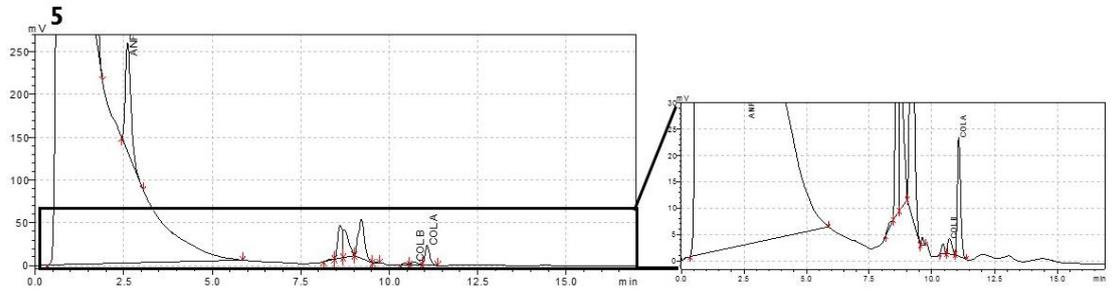
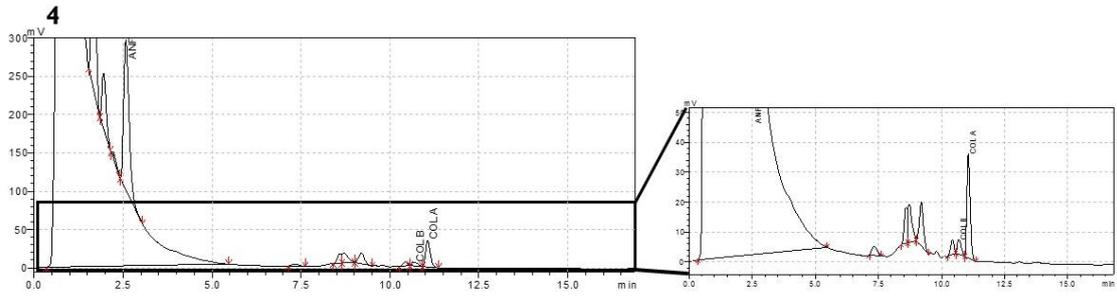
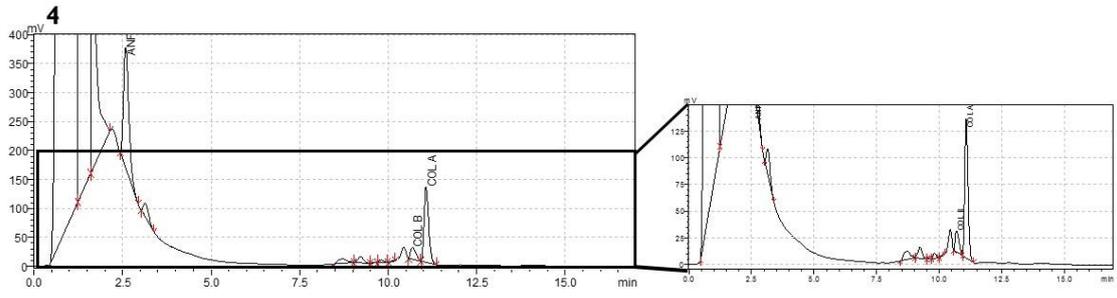


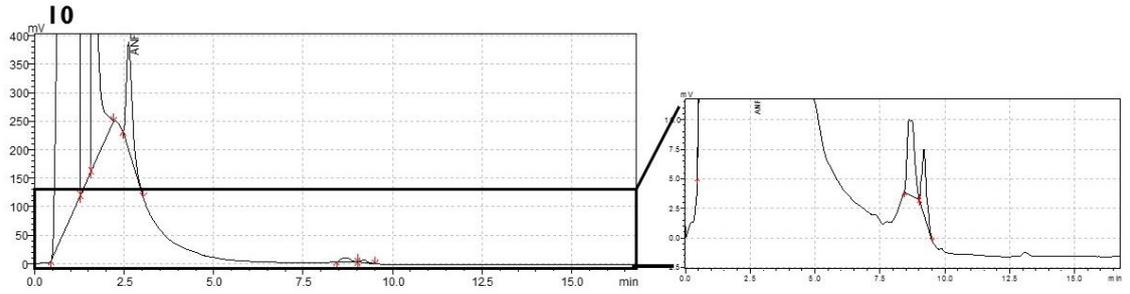
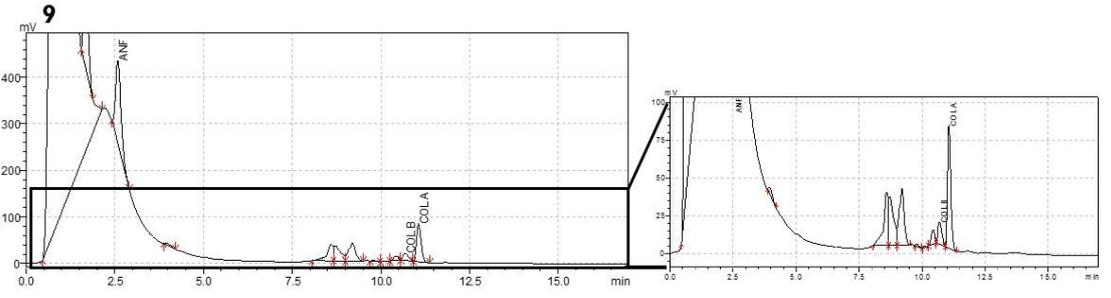
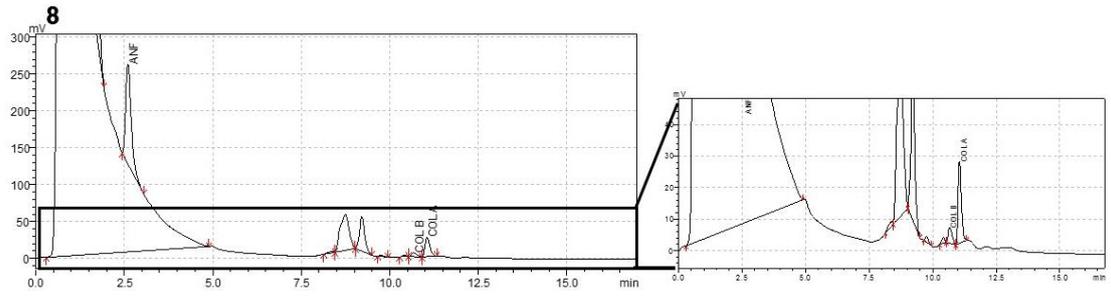
Tabela 12 - Concentração de Colistina total em plasma dos doentes em estudo, após aplicação do método desenvolvido e apresentado na presente dissertação.

Doente	Serviço de internamento	CrS (mg/dL)	Concentração plasmática da Colistina (µg/mL)
1	Cuidados cirúrgicos intermédios	2,86	0,355
			0,407
2	Medicina Interna	0,53	5,696
3	Queimados	0,69	10,906
			7,273
4	Queimados	0,75	6,018
			1,702
5	Hematologia	1,48	1,654
6	Urologia	1,02	0,651
7	Cirurgia B	0,76	1,471
8	Urologia	1,67	1,896
9	Urologia	1,38	4,604
10	Queimados	1,17	-

Figura 12 - Cromatogramas obtidos da quantificação das amostras clínicas dos doentes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10.







7. Discussão

7.1. Desenvolvimento do método

Na Tabela 6, é possível observar que a fase móvel constituída por 75% sulfato de sódio anidro e 25% ACN originou um tempo de retenção para a Colistina A e B demasiado cedo (1,46 e 0,96 minutos, respetivamente), havendo a possibilidade de, nos mesmos tempos de retenção, ocorrer a eliminação de substâncias endógenas à matriz, aquando a análise das amostras plasmáticas. Desta forma, houve necessidade de aumentar a fase orgânica da fase móvel, por forma a que os analitos interagissem mais com a fase estacionária e, conseqüentemente, fossem mais retidos. Após duplicar a percentagem de ACN da fase móvel, o tempo de retenção da Colistina aumentou conforme o esperado, no entanto a técnica não permitia a separação da Colistina A e B. Com o intuito de eliminar a sobreposição dos picos da Colistina A e B foram adicionados 5% de metanol à fase móvel (75% de sulfato de sódio anidro, 20% de ACN e 5% metanol), que permitiram distinguir claramente os picos de Colistina A e B (Figura 3). No entanto a fase móvel escolhida no final para continuar os estudos com a deteção por DAD foi 73% tampão sulfato de sódio anidro, 22% ACN e 5% metanol (Tabela 6).

Com o intuito de concentrar as amostras após a extração da Colistina das amostras plasmáticas, procedeu-se à fortificação de plasma (250 µL) com Colistina (50 µg/mL) e as amostras foram submetidas ao processo de SPE, tal como referido anteriormente na secção 6.1.1. e descrito na Tabela 7. Este processo de tratamento das amostras plasmáticas foi escolhido em detrimento de outros pela ampla descrição na literatura (Tabela 3), bem como pela sua capacidade de concentrar as amostras e de maximizar a eliminação e remoção das impurezas e possíveis interferentes à quantificação da Colistina. No entanto, apesar da sua capacidade de remoção de impurezas e interferentes, o processo de SPE aplicado (Tabela 7) não permitiu a obtenção de cromatogramas livres de interferentes nos tempos de retenção da Colistina, tal como é possível verificar na Figura 4. Os resultados obtidos são devidos ao facto de os interferentes das amostras serem bastante lipófilos e, conseqüentemente, interagirem muito com o agente adsorvente dos cartuchos SPE utilizados (C_{18}). Desta forma haveria a necessidade de utilizar um solvente de eluição mais polar ao utilizado, isto é, utilizar um solvente de eluição com maior percentagem em fase orgânica.

Na secção 6.1.2. foi referida a necessidade de proceder a um processo de derivatização para a deteção da Colistina por FL. Desta forma, houve necessidade de se escolher um agente derivatizante que permitisse derivatizar a Colistina, sem promover a sua degradação, por forma a poder ser quantificada. Nesta escolha, a informação compilada na Tabela 2 foi de extrema importância, uma vez que existem diversos agentes derivatizantes que podem ser aplicados no processo de derivatização da Colistina. Após a análise da referida tabela, e contrariamente à grande maioria da literatura contemplada na mesma, optou-se pelo cloreto de dansilo como agente derivatizante, uma vez que este já se encontrava disponível no laboratório, permitindo desta forma evitar os gastos que implicariam a aquisição de um outro agente derivatizante, e por ser um agente derivatizante usualmente utilizado na derivatização de aminas (JING, LI, JIANG, 2016). Selecionado o agente derivatizante, houve a necessidade de se estabelecer a concentração a utilizar do mesmo. Os resultados obtidos com o cloreto de dansilo na concentração de 1 mg/mL, indicaram a ocorrência de saturação, fenómeno descrito na literatura aquando da utilização de concentrações elevadas deste agente derivatizante, originando a estabilização da área dos picos na concentração de 0,3 mg/mL (JING, LI, JIANG, 2016). Desta forma diminuiu-se a concentração do cloreto de dansilo nos estudos posteriores, evitando o fenómeno de saturação.

Após o estudo de diversas fases móveis (secção 6.1.2.) sem a obtenção de alterações nos resultados, optou-se pelo estudo da influência do pH do 0,1 M tampão bicarbonato de sódio, utilizado como solvente para as soluções de fortificação e como agente de reconstituição. De acordo com a literatura, uma ampla gama de pH é utilizada (2,5-10) na quantificação da Colistina, no entanto a grande maioria dos métodos de HPLC recorrem a valores de pH iguais ou superiores a 8. Por este motivo e por, segundo o processo de derivatização desenvolvido por FUH et al, 2002, com o cloreto de dansilo como agente derivatizante, o pH estabelecido para o tampão bicarbonato de sódio (0,1M) foi 8,8, permitindo uma maior eficácia da reação de derivatização.

O primeiro processo de tratamento de amostras plasmáticas com Colistina, a detetar por FL, estudado foi a precipitação de proteínas. Para tal, foram selecionados três agentes precipitantes: ACN, 20% TCA: metanol (50: 50, v/v) e 20% TCA, tal como mencionado na secção 6.1.3.. Através dos resultados apresentados na Figura 8, é possível concluir que a mistura de 20% TCA e metanol (50: 50, v/v) é o agente precipitante mais eficaz na desnaturação das proteínas em amostras de plasma humano (100 µL) fortificadas com sulfato de Colistina (60 µg/mL). No entanto, quando se estudou a influência do aumento do volume de plasma (200 e 300 µL), aquando da adição do agente derivatizante (pós-precipitação

proteica) as amostras turvaram, indicando a ocorrência de precipitação de proteínas. Contudo este fenómeno foi menos intenso nas amostras submetidas a precipitação de proteínas com 20% TCA. A diferença entre os resultados obtidos de amostras plasmáticas com 100 µL de volume e com volume superior, ambas submetidas a precipitação de proteínas com a mistura 20% TCA: metanol (50: 50, v/v) e com 20% TCA, indicam que o metanol presente na mistura do agente precipitante diminui a capacidade de precipitação do TCA, em situações de maior volume.

Visto a Colistina ter sido quantificada com um simples processo de precipitação de proteínas, apenas se procedeu à otimização deste, por forma a que o processo de tratamento das amostras plasmáticas não se tornasse extenso nem dispendioso.

Para a seleção do PI houve a necessidade de serem ponderados fatores como a compatibilidade com a reação de derivatização com cloreto de dansilo, por forma a garantir-se a sua não degradação, e a disponibilidade no laboratório. Desta forma, foi selecionado o cloridrato de anfetamina, devido a encontrar-se descrito na literatura que o cloreto de dansilo é um bom agente derivatizante de amins (JING, LI, JIANG, 2016) e por ser o composto existente no laboratório que permitia garantir que, durante a reação de derivatização, não ocorresse a sua degradação afetando a sua quantificação e a da Colistina.

Após selecionado o PI, várias soluções deste foram analisadas recorrendo a diferentes fases móveis com eluição isocrática ou por gradiente (secção 6.1.4.). Devido à eluição isocrática da fase móvel 65% ACN e 35% água ultrapura a um fluxo de 0,7 mL/min promover a sobreposição dos tempos de retenção da Colistina e do PI, optou-se pela eluição da fase móvel por gradiente (Tabela 8). Com o primeiro programa de eluição por gradiente estudado (Tabela 8) os tempos de retenção da Colistina A e B eram muito tardios (18,07 e 16,91 minutos, respetivamente), impossibilitando uma rápida quantificação dos mesmos e uma retificação da posologia célere. Consequentemente o segundo programa de eluição por gradiente (Tabela 8) foi estudado, permitindo a obtenção de tempos de retenção inferiores aos anteriormente obtidos (14,10 e 14,93 minutos). Com o intuito de diminuir os tempos de retenção da Colistina A e B, foi aplicado o terceiro programa de eluição por gradiente (Tabela 8), que possibilitou a diminuição dos tempos de retenção da Colistina A e B em cerca de 3 minutos (12,68 e 11,87 minutos, respetivamente). O quarto programa de eluição (Tabela 8) foi avaliado com o objetivo de diminuir, ainda mais, os tempos de retenção dos analitos e, simultaneamente, diminuir o tempo de corrida (19 minutos). Os tempos de retenção da Colistina A e B foram, respetivamente, 11,07 e 10,68 minutos. Desta forma, o tempo de

corrida foi alterado para os 16 minutos (quinto programa de eluição por gradiente, Tabela 8), no entanto, o PI sofreu alteração no seu tempo de retenção dos, aproximadamente, 2,50 para os 1,39 minutos. Esta alteração no tempo de retenção o PI foi provocada pela diminuição de 1 minuto no tempo de estabilização da coluna cromatográfica entre corridas, passando dos 4 para os 3 minutos. Desta forma, para que se alcançasse um rápido tempo de corrida sem a interferência nos tempos de retenção do PI e dos analitos, o tempo de estabilização da fase estacionária foi novamente repostos nos 4 minutos, surgindo o sexto programa de eluição por gradiente (Tabela 8) que permitiu, com êxito, a quantificação da Colistina A e B, bem como do PI, em amostras de plasma humano.

7.2. Validação do método

Tendo por base as Figuras 10 e 12 infere-se, respetivamente, que foi possível demonstrar a ausência de resposta de amostras plasmáticas brancas e a não interferência dos fármacos concomitantemente administrados aos doentes, nos tempos de retenção da Colistina A e B, nos comprimentos de onda de 343 e 500 nm. É possível, ainda, inferir que os fármacos administrados ao doente 10 (doente sem administração de CMS) também não interferem nos tempos de retenção dos analitos, nos referidos comprimentos de onda (Figura 12).

A gama de concentrações para qual a linearidade da Colistina total, foi estudada e demonstrada foi 0,09-9,0 µg/mL ($r^2=0,993$; secção 6.2.2.), escolha realizada tendo em consideração as diversas gamas de calibração definidas na literatura e a sensibilidade do detetor de fluorescência utilizado. Assim sendo, o método desenvolvido é suficientemente sensível tendo em consideração a ampla gama de concentrações utilizada, isto porque nos limites inferior e superior da curva de calibração foi possível a quantificação da Colistina total com boa linearidade ($r^2=0,993$), exatidão e precisão.

Tendo em conta os resultados obtidos e descritos na Tabela 9, é possível verificar que todos os valores preenchem os critérios de aceitação para a precisão e a exatidão. Desta forma é possível concluir que o presente método de HPLC-FL desenvolvido para a quantificação de Colistina em plasma humano é preciso, exato e reprodutível, mesmo no LLOQ.

A análise dos resultados da Tabela 10 (secção 6.2.4.) revela que a recuperação média da Colistina total é consistente ao longo da gama de concentrações avaliada. Os valores médios da recuperação dos analitos variaram entre os 55,01% e os 65,24%, e os valores de CV

calculados encontravam-se no limite de aceitação. Apesar do valor da recuperação ser relativamente baixo e os valores de CV encontrarem-se no limite de aceitação, o que, associado à ampla gama de concentrações utilizada (0,09-9,0 µg/mL) e à precisão e exatidão do método, quer no limite inferior, quer no limite superior da curva de calibração, corroboram que o método de extração da Colistina é fiável e suficiente para a sua aplicação a amostras biológicas. A recuperação do PI também foi analisada, sendo o valor médio da sua recuperação similar ao da Colistina (49,51%).

A análise referente à Tabela II (secção 6.2.5.) conclui que o fármaco, nas concentrações do CQ₁ e do CQ₃, não sofre degradação significativa em plasma humano fortificado durante 24 horas a 4°C ou durante 30 dias a -24°C ou durante 2 horas à temperatura ambiente. Também permite inferir que não ocorre degradação significativa do fármaco em amostras pós-tratamento durante 24 horas a 4°C. Consequentemente, é possível concluir que a Colistina é estável nas condições de estabilidade avaliadas.

7.3. Aplicação do método a amostras clínicas

Para que o método desenvolvido, otimizado e validado na presente dissertação seja aplicado na monitorização sérica dos doentes internados no CHUC, é necessário o estabelecimento de programas otimizados de colheita das amostras, por forma a evitar a discrepância nos períodos de tempo entre a administração do CMS e a colheita da amostra sanguínea observados (Tabelas 5). Para que tal seja possível, as colheitas devem ser realizadas imediatamente antes da administração da terceira dose de CMS, uma vez que apenas a este tempo a Colistina atinge a concentração de equilíbrio e a concentração do profármaco é mínima, tal como referido anteriormente (secção 3.2.2.). Caso contrário a otimização posológica torna-se difícil e morosa, promovendo a detioração do estado clínico do doente e o aumento das resistências antibacterianas a este precioso fármaco.

Apesar da heterogeneidade nos tempos entre a administração do CMS e a colheita da amostra, é possível inferir, na generalidade, que quanto maior o tempo entre a administração do profármaco e a colheita da amostra, menor é a concentração plasmática quantificada e vice-versa, tal como seria expectável (Tabelas 5 e 12). A dose de CMS mais frequentemente utilizada é 1 MIU, podendo ser administrada em três períodos de tempo: 8 em 8 horas, 12 em 12 horas e 24 em 24 horas, sendo o mais usual o intervalo de 8 horas (Tabela 5). Este cenário clínico coincide com o intervalo de tempo posológico considerado mais vantajoso para a minimização das resistências antibacterianas descrito na literatura (secção 3.2.1.). Para que

sejam atingidas concentrações iguais ou superiores à MIC é necessário otimizar o período de tempo decorrido entre a administração do CMS e a colheita da amostra, por forma a evitar a prática de um regime posológico universal, não adaptado às características farmacocinéticas de cada doente nem à estirpe infetante. Por conseguinte, a pertinência e a urgência da aplicação do presente método à prática clínica são reforçadas.

Das amostras clínicas analisadas apenas uma não foi contemplada na curva de calibração selecionada (Tabela 12), indicando a necessidade da existência de um controlo de qualidade de diluição (CQ_{Dil}). O CQ_{Dil} é um controlo da qualidade aplicado quando existem amostras com concentração do(s) analito(s) superior à gama de calibração, por forma a evitar a extrapolação para além dos seus limites. Este fenómeno é denominado de efeito da diluição, devendo ser estudadas as suas precisão e exatidão, durante a validação do método, procedendo-se à diluição da amostra em brancos da matriz biológica utilizada e à sua reanálise. A obtenção deste valor de concentração pode ser devido à combinação terapêutica do CMS pelas vias IV e inalatória, sendo administradas, no total, 3 MIU de 8 em 8 horas (Tabela5). Apesar de não ser o único doente a receber terapêutica combinada de CMS, é o único que recebe esta dosagem (3 MIU) num curto período de tempo.

Analisando a Figura 12, é possível verificar que, de todos os fármacos concomitantemente administrados com o CMS, apesar de promoverem o aparecimento de picos que não correspondem ao fármaco ou ao PI, nenhum foi interferente nos tempos de retenção da Colistina A e B. O mesmo pode ser afirmado para a amostra do doente 10, que apesar de no seu plano de medicação não ser contemplado o CMS, nenhum pico dos fármacos administrados coincide com os tempos de retenção da Colistina A e B.

8. Conclusões

O método de HPLC-FL desenvolvido, submetido a validação total e apresentado nesta dissertação é seletivo, sensível, preciso, exato e reprodutível para a quantificação de Colistina em plasma humano.

O processo de tratamento de amostras aplicado não é dispendioso, uma vez que combina a precipitação de proteínas plasmáticas com uma reação de derivatização simples e prática, através das quais se obtém valores de recuperação razoáveis.

Assim sendo, é possível concluir que o presente método de HPLC-FL é uma ferramenta importante para a monitorização sérica da Colistina em amostras de doentes internados no CHUC, E. P. E..

9. Bibliografia

AZAD, Mohammad et al - Major pathways of polymyxin-induced apoptosis in rat kidney proximal tubular cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59, 4 (2015), 2136-2143. doi: 10.1128/AAC.04869-14

BAI, Ligai et al - A simple HPLC method for the separation of colistimethate sodium and colistin sulphate. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*. 2, 1 (2011), 1-4. doi: 10.4172/2157-7064.1000105

BASSETTI, Matteo, RIGHI, Elda - Multidrug-resistant bacteria: what is the threat?. *American Society of Hematology*. (2013), 428-432

BASSETTI, Matteo - Colistin how to use it?. [2 de Março 2016]. Disponível na Internet: <http://www.gis.pt/Ficheiros/Apresentacoes/17Simposio/Matteo%20Bassetti%20Colistin.pdf>

BERGEN, Phillip, LI, Jian, NATION, Roger - Dosing of colistin – back to basic PK/PD. *Current Opinion in Pharmacology*. 11, (2011), 464-469. doi: 10.1016/j.coph.2011.07.004

BISWAS, Silpak et al - Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 10, 8 (2012), 917-934. doi: 10.1586/eri.12.78

BICKER, Joana et al - Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples – A review. *Analytica Chimica Acta*. 768, (2013), 12-34. doi: 10.1016/j.aca.2012.12.030

CHEPYALA, Divyabharathi et al - Development and validation of a high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for the accurate quantification of colistin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 980, (2015), 48-54. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.12.015

CHUST, Rafael - Introdução à cromatografia de líquidos (HPLC). *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*. 39, (1990), 43-53

COUET, William et al - Pharmacokinetics of colistin and colistimethate sodium after a single 80-mg intravenous dose of CMS in young healthy volunteers. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 89, 6 (2011), 875-879. doi: 10.1038/clpt.2011.48

DAI, Chongshan et al - Colistin-induced nephrotoxicity in mice involves the mitochondrial, death receptor, and endoplasmic reticulum pathways. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58, 7 (2014), 4075-4085. doi: 10.1128/AAC.00070-14

DAI, Chongshan et al - Colistin-induced apoptosis of neuroblastoma-2a cells involves the generation of reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction, and autophagy. *Molecular Neurobiology*. 53, 7 (2015), 4685-4700. doi: 10.1007/s12035-015-9396-7

DHARIWAL, A. K., TULLU, M. S. - Colistin: re-emergence of the “forgotten” antimicrobial agent. *Journal of Postgraduate Medicine*. 59, 3 (2013), 208-215. doi: 10.4103/0022-3859.118040

DICIONÁRIO SAÚDE - Ventriculite. (2014). [21 de Janeiro de 2016]. Disponível na Internet: <http://dicionariosaude.com/ventriculite/>

DRUGBANK – Colistin. 2005. [15 de Março de 2016]. Disponível na Internet: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00803>

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA) – Guideline on Bioanalytical Method Validation. (2012)

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA) - EMA on advice use of colistin in animals to be updated. (2016)

EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE NETWORK (EARS-NET) - Antimicrobial resistance surveillance in Europe. (2014)

FELÍCIO, André - Meningite. [21 de Janeiro de 2016] Disponível na Internet: <http://www.minhavidade.com.br/saude/temas/meningite>

FUH, Ming-Ren et al – Simultaneous determination of free-form amphetamine in rat’s blood and brain by in-vivo microdialysis and liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta*. 58 (2002), 1357-1363. doi: 10.1016/S0039-9140(02)00423-X

GARONZIK, Samira et al - Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55, 7 (2011), 3284-3294. doi: 10.1128/AAC.01733-10

GENERIS - Resumo das características do medicamento – Colistina. [2 de Março de 2016]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/genericos/pesquisamg/pesquisaMG.php>

GIAMARELLOU, Helen - Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 36S, (2010), S50-S54. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.11.014

GIKAS, Evangelos et al - Determination of colistin A and colistin B in human plasma by UPLC–ESI high resolution tandem MS: application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 83, (2013), 228-236. doi: 10.1016/j.jpba.2013.05.008

GIL, Raquel - Avaliação da lesão aguda no doente crítico. (2012), 31pp

GMUR, Dennis et al - Determination of polymyxin E in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 789, (2003), 365-372. doi: 10.1016/S1570-0232(03)00162-4

GOBIN, Patrice et al - Assay of colistin and colistin methanesulfonate in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54, 5 (2010), 1941-1948. doi: 10.1016/S1570-0232(03)00162-4

IMBERTI, Roberto et al - Pharmacokinetics of colistin in cerebrospinal fluid after intraventricular administration of colistin methanesulfonate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56, 8 (2012), 4416-4421. doi: 10.1128/AAC.00231-12

JASSON, Britt et al - Quantitative analysis of colistin A and colistin B in plasma and culture medium using a simple precipitation step followed by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 49, (2009), 760-767. doi: 10.1016/j.jpba.2008.12.016

JIANG, Hong et al - Colistin-induced apoptosis in PC12 cells: involvement of the mitochondrial apoptotic and death receptor pathways. *International Journal of Molecular Medicine*. 33, (2014), 1298-1304. doi: 10.3892/ijmm.2014.1684

JIN, Liang et al - Brain penetration of colistin in mice assessed by a novel high-performance liquid chromatographic technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53, 10 (2009), 4247-4251 doi: 10.1128/AAC.00485-09

JING, Shao-Jun, LI, Qing-Lian, JIANG, Ye – A new Simultaneous derivatization and microextraction method for the determination of memantine hydrochloride in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 1008 (2016), 26-31. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.09.016

JUSTO, Julie, BOSSO, John - Adverse reactions associated with systemic polymyxin therapy. *Pharmacotherapy*. 35, 1 (2015), 28-33. doi: 10.1002/phar.1493

KASSAMALI, Zahra, DANZIGER, Larry - To B or not to B, that is the question: is it time to replace colistin with polymyxin B?. *Pharmacotherapy*. 35, 1 (2015), 17-21. doi: 10.1002/phar.1510

KOCH-WESER, Jan et al - Adverse effects of sodium colistimethate: manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Annals of Internal Medicine*. 72, 6 (1970), 857-868. doi: 10.7326/0003-4819-72-6-857

KWA, Andrea et al - Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 5, 5 (2007), 811-821. doi: 10.1002/phar.1510

LEE, Sun-hyo et al - P-Glycoprotein Induction Ameliorates Colistin Induced Nephrotoxicity in Cultured Human Proximal Tubular Cells. *PLOS One*. 10, 8 (2015), 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0136075

LEXICOMP - Colistimethate (Lexi-Drugs Multinational). [2 de Março de 2016]. Disponível na Internet: http://online.lexi.com/lco/action/doc/retrieve/docid/multinat_f/4668568

LI, Jian et al - In vitro pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45, 3 (2001), 781-785. doi: 10.1128/AAC.45.3.781-785.2001

LI, Jian et al - A simple method for the assay of colistin in human plasma, using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate in solid-phase extraction cartridges and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 761, 2 (2001), 167-175. doi: 10.1016/S0378-4347(01)00326-7

LI, Jian et al - Simple method for assaying colistin methanesulfonate in plasma and urine using high-performance liquid chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46, 10 (2002), 3304-3307. doi: 10.1128/AAC.46.10.3304-3307.2002

LI, Jian et al - Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53, (2004), 837-840. doi: 10.1093/jac/dkh167

LI, Jian et al - Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases*. 6, (2006), 589-601. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70580-1

LIM, Lauren et al - Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy*. 30, 12 (2010), 1279-1291. doi: 10.1592/phco.30.12.1279

LÓPEZ, Francisco - XII Curso de Determinación de Fármacos por HPLC en Muestras Biológicas. (2009)

LOZANO, Pilar et al - Application of a validated method in the stability study of colistin sulfate and methylparaben in a veterinary suspension formulation by high-performance liquid chromatography with a diode array detector. *Journal of AOAC International*. 90, 3 (2007), 706-714

MELDAU, Débora - Miastenia Grave. (2006). [21 de Janeiro de 2016]. Disponível na Internet: <http://www.infoescola.com/doencas/miastenia-grave/>

MERCIER, Thomas et al - High-throughput hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the optimized quantification of the anti-Gram-negatives antibiotic colistin A/B and its pro-drug colistimethate. *Journal of Chromatography A*. 1369, (2014), 52-63. doi: 10.1016/j.chroma.2014.09.063

MERCK MANUALS - Polymyxins. (2015). [15 de Março de 2016]. Disponível na Internet: http://www.merckvetmanual.com/mvm/pharmacology/antibacterial_agents/polymyxins.html

MICHALOPOULOS, Argyris, KARATZA, Dimitra - Multidrug-resistant Gram-negative infections: the use of colistin. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 8, 9 (2010), 1009-1017. doi: 10.1586/ERI.10.88

MICHALOPOULOS, Argyris, FALAGAS, Matthew - Colistin: recent data on pharmacodynamics properties and clinical efficacy in critically ill patients. *Annals of Intensive Care*. 1, 30 (2011), 1-6. doi: 10.1186/2110-5820-1-30

MICHALOPOULOS, Argyris, KARATZA, Dimitra, GREGORAKOS, Leonidas - Pharmacokinetic evaluation of colistin sodium. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 7, 2 (2011), 245-255. doi: 10.1517/17425255.2011.541439

MOHAMED, Ami et al - Application of a loading dose of colistin methanesulfonate in critically ill patients: population pharmacokinetics, protein binding, and prediction of bacterial kill. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56, 8 (2012), 4241-4249. doi: 10.1128/AAC.06426-11

MOUTON, Johan et al - Conserving antibiotics for the future: new ways to use old and new drugs from a pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Drug Resistance Updates*. 14, (2011), 107-117. doi: 10.1016/j.drug.2011.02.005

MUÑOZ, S., CASTRO, M. - Dynamic ultrasound-assisted extraction of colistin from feeds with on-line pre-column derivatization and liquid chromatography-fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*. 1066, (2005), 1-7. doi: 10.1016/j.chroma.2005.01.010

NATION, Roger, LI, Jian - Colistin in the 21st century. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 22, 6 (2009), 535-543. doi: 10.1097/QCO.0b013e328332e672

NATION, Roger et al - Consistent Global Approach on Reporting of Colistin Doses to Promote Safe and Effective Use. *Clinical Infectious Diseases*. 58, (2013), 139-141. doi: 10.1093/cid/cit680

PLACHOURAS, Diamantis et al - Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53, 8 (2009), 3430-3436. doi: 10.1128/AAC.01361-08

REED, Michael et al - The pharmacokinetics of colistin in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 41, (2001), 645-654. doi: 10.1177/00912700122010537

SARKAR, Sohini, DESANTIS, Evelyn, KUPER, Jeff - Resurgence of colistin use. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 64, 23 (2007), 2462-2466. doi: 10.2146/ajhp060501

SIN, Della et al - Analysis of major components of residual bacitracin and colistin in food samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 535, (2005), 23-31. doi: 10.1016/j.aca.2004.11.063

SORLÍ, Luisa et al - Trough colistin plasma level is an independent risk factor for nephrotoxicity: a prospective observational cohort study. *BMC Infectious Diseases*. 13, 380 (2013), 1-9. doi: 10.1186/1471-2334-13-38

THEURETZBACHER, Ursula - Product information for parenteral colistin varies substantially across Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69, 7 (2014), 1987-1992. doi: 10.1093/jac/dku064

THOMAS, Tiffany et al - High performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) assay for polymyxin B1 and B2 in human plasma. *Therapeutic Drug Monitoring*. 34, 4 (2012), 398-405. doi: 10.1097/FTD.0b013e31825c827a

TSAI, I-Lin et al - Simultaneous quantification of antimicrobial agents for multidrug-resistant bacterial infections in human plasma by ultra-high-pressure liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Talanta*. 116, (2013), 593-603. doi: 10.1016/j.talanta.2013.07.043

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) – Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. (2001)

XU, Yingjiang et al - Analysis of colistin A and B in fishery products by ultra-performance liquid chromatography with positive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 899, (2012), 14-20. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.04.028

WALLACE, Stephanie et al - Physicochemical aspects of the coformulation of colistin and azithromycin using liposomes for combination antibiotic therapies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 102, 5 (2013), 1578-1587. doi: 10.1002/jps.23508