

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e validação de método para análise do topiramato
em amostras de plasma por eletroforese capilar com detecção
UV/vis e C4D**

Aline Akemi Ishikawa

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e validação de método para análise do topiramato
em amostras de plasma por eletroforese capilar com detecção
UV/vis e C4D**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Aline Akemi Ishikawa
Orientadora: Prof^a. Dr^a.Cristiane Masetto de Gaitani
Coorientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 20/04/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ishikawa, Aline Akemi

Desenvolvimento e validação de método para análise do topiramato em amostras de plasma por eletroforese capilar com detecção UV/vis e C4D. Ribeirão Preto, 2016.

61 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Gaitani, Cristiane Masetto.

1. Topiramato. 2. Eletroforese capilar. 3. UV/vis. 4. C4D.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Akemi Ishikawa

Desenvolvimento e validação de método para análise do topiramato em amostras de plasma por eletroforese capilar com detecção UV/vis e C4D

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Masetto de Gaitani

Coorientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Edivaldo e Alice Ishikawa,

pela confiança , por acreditarem no meu sonho...

Aos meus irmãos, Eduardo e Edson Ishikawa,

que mesmo distantes sempre se orgulharam de mim....

As minhas tias Izaura Ishigami e Helena Enokihara

que sempre estiveram presente nos momentos mais difíceis....

À Eliza Ishigami (in memoriam),

por sempre se orgulhar de mim...

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde, pelos momentos difíceis que nos ensinam e os alegres que nos revigoram.

A minha família por sempre acreditarem no meu sonho

Prof^a Dr^a Cristiane Masetto de Gaitani, minha orientadora, pela paciência e por ter aceitado o desafio de me orientar mesmo com todas as minhas dificuldades, por ensinar além dos valores acadêmicos os valores da vida e da família.

Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho, meu coorientador, por ter aberto as portas do seu laboratório, pela paciência e por compartilhar sua vasta experiência científica.

Ao Prof. Dr. Carlos D. Garcia, meu coorientador nos Estados Unidos, por ter me aceitado em seu laboratório e mesmo em meio a minhas dificuldades, teve paciência em me ensinar, me proporcionando grandes ensinamentos acadêmicos.

Aos professores Prof. Dr. Zeeki Naal e Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira, por sempre estarem dispostos a solucionar minhas dúvidas e contribuir em minha formação científica.

Aos professores Prof. Dr. Pedro Rocha Filho e Prof. Dr. Álvaro Santos Neto por todo o aprendizado no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE)

Aos amigos do laboratório de Técnicas de Separação e Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP: Fernando Armani, Greyce Kelly, Luciana Lourenço, Jennifer Yokoya, Lanuze Toni, Leticia Schiave, Mariana Demets pela amizade e apoio em todos os momentos. Um agradecimento em especial a Rodrigo Moreira e Luiza Barros por terem paciência de me ensinar, por sempre colaborarem com meus trabalhos e pelas infinitas discussões científicas.

Aos **amigos** do grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações – BIOMICS do Instituto de Química de São Carlos – USP. Um agradecimento em especial a Thiago Segato e Jonatan Catai, pela paciência, por colaborar de forma impar em todos os meus trabalhos, bem como o meu crescimento científico.

Aos **meus amigos** do Laboratório de Metabolismo in vitro e Técnicas de Separação do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto –USP, que além de parceiros científicos tornaram se grandes amigos pessoais. Um agradecimentos em especial a Nayara Perez de Albuquerque e Simone Fortes que além de grandes amigas, sempre me acolheram em suas casas.

Aos **meus amigos** Mauro Sérgio Ferreira Santos e Eric Tavares da Costa, pelo companheirismo, pela paciência, pelos ensinamentos científicos, por sempre me darem forças em momentos de dificuldades, bem como colaborar de forma inenarrável para minha formação científica e pessoal.

Ao meu **tio** Paulo Ishigami e a minha **prima** Maria Alice Tsunechiro pelo apoio financeiro durante os congressos que me proporcionaram grandes aprendizados.

À minha grande **amiga** Maria Aldonia Pepi, que me acolheu em sua casa durante a minha estadia em São Carlos, pelas longas conversas depois do trabalho e por sempre acreditar em mim.

À meu **amigo** Felipe Miguel, por todos os ensinamentos em informática, que contribuíram muito para realização deste trabalho.

Ao meu **amigo** Bruno Rocha por sempre acreditar em mim.

À minha **amiga** Aline Martchely Veloso, pela amizade, pelas longas conversas, que mesmo sem entender sobre o meu trabalho, se dedicou a ler e contribuir para melhora do mesmo.

Ao **Programa de Pós-graduação em Toxicologia** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Em especial a Rosemary Ioshimine Gerolineto pela amizade e por sempre torcer por mim

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro

*A **todos** que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.*

RESUMO

ISHIKAWA, A. A. **Desenvolvimento e validação de método para análise do topiramato em amostras de plasma por eletroforese capilar com detecção UV/vis e C4D** 2016. 61f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O topiramato (TPM) é um fármaco antiepiléptico utilizado para o controle de crises epiléticas generalizadas e parciais em adultos e crianças. A determinação da concentração plasmática do TPM em associação com as observações clínicas é de suma importância, uma vez que permite o ajuste individual da dose administrada ao paciente, diminuindo a incidência de reações adversas e melhorando a adesão ao tratamento. No presente trabalho, dois métodos bioanalíticos foram desenvolvidos e validados para análise do TPM em amostras de plasma, por eletroforese capilar utilizando os detectores DAD (detecção indireta) e C⁴D Lite (detecção condutométrica). A análise eletroforética para ambos os métodos foi realizada em um capilar de sílica fundida de 75 µm de diâmetro interno e 40 cm de comprimento efetivo. O eletrólito de corrida foi composto por trietanolamina (TEA) 15 mmol L⁻¹ para a detecção condutométrica e TEA 15 mmol L⁻¹, ácido 3,5 dinitrobenzóico (DNB) 5 mmol L⁻¹ e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) 0,4 mmol L⁻¹ para detecção indireta. As injeções foram feitas no modo hidrodinâmico a 0,8 psi por 5 segundos e a tensão aplicada foi de -20 e 20 kV para detecção indireta e condutométrica, respectivamente. Nestas condições, o TPM migrou em 2,5 min. O preparo das amostras foi realizado por extração líquido-líquido (LLE), usando éter metil-terc-butílico (MTBE) como solvente extrator e utilizando 500 e 200 µL de plasma para o método com detecção indireta e condutométrica, respectivamente. Os métodos foram validados de acordo com os guias oficiais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e *European Medicine Agency* e apresentaram linearidade no intervalo de concentração plasmática de 1-30 µg mL⁻¹ e valores de precisão e exatidão abaixo de 15 %, além de serem seletivos. Assim, ambos os métodos foram aplicados com sucesso em amostras de plasma de pacientes em tratamento com o TPM. Embora os detectores universais geralmente apresentem um maior limite de detecção comparado com detectores seletivos, o método com detecção condutométrica desenvolvido neste trabalho apresentou como vantagem maior sensibilidade em relação método indireto (DAD). Além disso, apresentou também vantagens como simplicidade e baixo custo, mostrando viabilidade na aplicação para análises de rotina.

Palavras-chave: C⁴D, eletroforese capilar, plasma, topiramato, UV/vis.

ABSTRACT

ISHIKAWA, A. A. **Development and validation of method for analysis of topiramate in plasma samples by capillary electrophoresis with UV/vis and C4D detection** 2016. 61f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Topiramate (TPM) is an antiepileptic drug that has been used as an agent for the control of partial and generalized seizures in both adults and children patients. The determination of the plasmatic concentration of TPM in association with clinical observations is of utmost importance for the individual adjustment of the administered dose to the patient. In the present work, two bioanalytical methods have been developed and validated for TPM analysis in plasma samples by capillary electrophoresis using DAD (indirect detection) and C⁴D Lite detectors (conductometric detection). The electrophoretic analysis for both methods were performed on a fused silica capillary of 75 μm of internal diameter and 40 cm effective length. The background electrolyte was composed of triethanolamine (TEA) 15 mmol L^{-1} for conductometric detection and TEA 15 mmol L^{-1} , 3,5 dinitrobenzoic acid (DNB) 5 mmol L^{-1} and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 0.4 mmol^{-1} for indirect detection. The injections were carried out in hydrodynamic mode, at 0.8 psi for 5 seconds, and the voltage applied were -20 e 20 kV for indirect and conductometric detection, respectively. Under these conditions, TPM migrated in 2.5 min. The sample preparation was carried out by liquid liquid extraction (LLE) using methyl tert-butyl ether (MTBE) as solvent, and using 500 and 200 μL of plasma samples for direct and conductometric detection, respectively. The methods were validated according to the official guides of the *Agência Nacional de Vigilância Sanitária* and European Medicine Agency, and showed linearity in plasmatic concentration range of 1-30 mg L^{-1} , precision and accuracy values below 15%, beside selectivity. Both methods have been applied successfully to analysis of plasma samples of patients in treatment with TPM. Although universal detectors have a higher quantification limit compared with selective detectors, the method with conductometric detection developed in this work presented greater sensitivity than indirect method (DAD). Furthermore, it also presented advantages such as simplicity and low cost, showing feasibility in applying to routine analysis.

Keywords: Capillary electrophoresis, C⁴D, human plasma, topiramate, UV/vis, detector

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem ou que os seus planos nunca vão dar certo ou que você nunca vai ser alguém...”

Renato Russo

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura química do TPM..... | 3 |
| Figura 2. Esquema do equipamento de CE..... | 6 |
| Figura 3. Representação da formação da dupla camada no interior do capilar..... | 7 |
| Figura 4. Perfil do fluxo planar (A) e parabólico (B)..... | 9 |
| Figura 5. Mobilidade coeletrosmótico e contraeletrosmótico..... | 9 |
| Figura 6. Representação esquemática da formação de subcamadas do tensoativo catiônico e da migração de ânions sob EOF invertido..... | 11 |
| Figura 7. Equipamento de CE com detector DAD..... | 14 |
| Figura 8. Detectores C ⁴ D Lite (8a) e detector comercial da Edaq (8b)..... | 16 |
| Figura 9. Detectores C ⁴ D acoplado ao equipamento de CE (9a) e figura esquemática do equipamento de CE com detectores C ⁴ D (9b)..... | 17 |
| Figura 10. Fluxograma do procedimento de extração por LLE para análise do TPM em amostras de plasma utilizando detecção indireta e condutométrica..... | 24 |
| Figura 11. Influência da variação da concentração TEA no fator assimetria e na eficiência do TPM. Condições eletroforéticas: capilar de 75 µm de DI, 40 cm de C _{ef} ; BGE composto por CTAB 0,2 mmol L ⁻¹ , DNB 5 mmol L ⁻¹ pH 11,3, tensão aplicada: -20 kV, temperatura de 30°C, injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5 s), comprimento de onda de 254 nm..... | 33 |
| Figura 12. Influência das diferentes concentrações de DNB em relação ao sinal/ruído. Condições eletroforéticas: capilar de 75 µm de DI, 40 cm de C _{ef} ; BGE composto por TEA 15 mmol L ⁻¹ , CTAB 0,2 mmol L ⁻¹ pH 11,3, tensão aplicada: -20 kV, temperatura de 30°C, injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5s), comprimento de onda de 254nm..... | 34 |
| Figura 13. Influência da variação da concentração do CTAB no tempo de migração do TPM e no fator assimetria do TPM. Condições eletroforéticas: capilar de 75 µm de DI, 40 cm de C _{ef} ; BGE composto por TEA 15 mmol L ⁻¹ , DNB 5 mmol L ⁻¹ , pH 11,3, tensão de -20 kV, temperatura de 30°C, injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5s), comprimento de onda de 254 nm..... | 35 |
| Figura 14. Eletroferogramas referentes às análises das amostras de plasma fortificadas com TPM (1) na concentração plasmática de 1µg mL ⁻¹ com a adição do CTAB no BGE (A) e sem adição do CTAB (B). Condições eletroforéticas: capilar de 75 µm de DI, 40 cm de C _{ef} ; BGE composto por DNB 0,4 mmol L ⁻¹ , TEA 15 mmol L ⁻¹ pH 11,3, tensão de -20 kV, temperatura de 30°C, injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5s), comprimento de onda de 254 nm..... | 36 |
| Figura 15. Eletroferogramas referentes às análises das amostras de plasma fortificadas com TPM (1) na concentração plasmática de 2µg mL ⁻¹ com a adição do CTAB no BGE (A) e sem adição do CTAB (B). Condições eletroforéticas: capilar de | |

75 μm de DI, 40 cm de C_{ef} ; BGE composto por DNB 0,4 mmol L^{-1} , TEA 15 mmol L^{-1} pH 11,3, tensão de -20 kV, temperatura de 30°C, injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5s), comprimento de onda de 254 nm. 36

Figura 16. Influência da tensão sobre a corrente. Condições eletroforéticas: capilar de 75 μm de DI, 40 cm de C_{ef} ; BGE composto por TEA 15 mmol L^{-1} , DNB 5 mmol L^{-1} , CTAB 0,4 mmol L^{-1} pH 11,3, temperatura de 30°C, injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5 s), comprimento de onda de 254 nm..... 37

Figura 17. Influência da variação da temperatura no tempo de migração e na eficiência do TPM. Condições eletroforéticas: capilar de 75 μm de DI, 52 C_{tot} e 40 cm de C_{ef} ; BGE composto por CTAB 0,4 mmol L^{-1} , TEA 15 mmol L^{-1} , DNB 5 mmol L^{-1} pH 11,3 tensão de -20 kV, injeção hidrodinâmica (0,8 psi, 5s), comprimento de onda de 254nm..... 38

Figura 18. Influência da concentração de TEA no fator de assimetria e na eficiência do pico do TPM. Condições eletroforéticas: capilar de 75 μm de DI, 52 C_{tot} e 40 cm de C_{ef} ; BGE composto por CTAB 0,4 mmol L^{-1} , TEA 15 mmol L^{-1} , DNB 5 mmol L^{-1} pH 11,3 tensão de -20 kV, injeção hidrodinâmica (0,8 psi, 5s)40

Figura 19. Influência da tensão sobre a corrente elétrica. Condições eletroforéticas: capilar de 75 μm de diâmetro interno, 40 cm de C_{ef} ; BGE composto por TEA 15 mmol L^{-1} pH 11,3, temperatura de 30 °C, injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5 s) 40

Figura 20. Efeito do solvente orgânico na extração do TPM para o método com detecção indireta (DAD) 43

Figura 21. Eletroferograma representativo da seletividade do método. Amostra fortificada com 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TPM (A); amostra de plasma branco (B). TPM (1). Condições eletroforéticas: capilar de 75 μm de DI, 52 C_{tot} e 40 cm de C_{ef} ; BGE composto por DNB 0,4 mmol L^{-1} , CTAB 0,4 mmol L^{-1} , TEA 15 mmol L^{-1} pH 11,3, tensão de -20 kV, temperatura de 30°C, injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5s), comprimento de onda de 254 nm..... 45

Figura 22. Eletroferograma representativo da seletividade do método. Amostra fortificada com 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TPM (A); amostra de plasma branco (B). TPM (1), 2-naftol β (2). Condições eletroforéticas: capilar de 75 μm de DI, 52 C_{tot} e 40 cm de C_{ef} ; BGE: TEA 15 mmol L^{-1} pH 11,3, tensão de 20 kV, temperatura de 30°C, injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5s)..... 46

Figura 23. Eletroferograma representativo de uma amostra de plasma de paciente sob tratamento com TPM (A) e amostra de plasma branco fortificado com TPM na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (B). TPM (1)..... 51

Figura 24. Eletroferograma representativo de uma amostra de plasma de um paciente sob tratamento com TPM (A) e amostra de plasma branco fortificado com TPM na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (B). TPM (1) e 2 naftol β (2)..... 52

Figura 25. Concentrações plasmáticas de 10 pacientes sob tratamento com TPM, analisados pelo método proposto com os detectores DAD e C^4D comercial. 53

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Condicionamento do capilar para análise do TPM..... | 32 |
| Tabela 2. Condições estabelecidas para análise do TPM. | 41 |
| Tabela 3. Linearidades dos métodos para análise do TPM | 47 |
| Tabela 4. Precisão, exatidão e LIQ do método para análise TPM com detecção indireta e condutométrica | 48 |
| Tabela 5. Estabilidade do TPM para o método com detecção indireta e condutométrica..... | 49 |
| Tabela 6. Linearidade do método para detecção condutométrica comercial. | 50 |
| Tabela 7. Precisão e exatidão da validação parcial do método de quantificação do TPM em plasma, com detecção condutométrica comercial. | 50 |
| Tabela 8: Medicamentos coadministrados concomitante com o TPM e quantificação do TPM em pacientes epiléticos utilizando os detectores DAD e C ⁴ D comercial ... | 53 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Métodos para análise do TPM em amostras biológicas | 5 |
| Quadro 2: Comparação entre alguns sistemas de detecção usados em eletroforese capilar..... | 13 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| BGE | Eletrólito de corrida |
| C ⁴ D | Detector condutométrico sem contato capacitivamente acoplado |
| CBZ | Carbamazepina |
| CE | Eletroforese capilar |
| C _{ef} | Comprimento efetivo |
| CLB | Clobazam |
| CQA | Controle de qualidade de alta concentração |
| CQB | Controle de qualidade de baixa concentração |
| CQM | Controle de qualidade de média concentração |
| CTAB | Brometo de cetiltrimetilamônio |
| C _{tot} | Comprimento total |
| CV | Coefficiente de variação |
| DAD | Detector de arranjo diodo |
| DNB | Ácido 3,5 dinitrobenzóico |
| DTAB | Brometo de dodeciltrimetilamônio |
| EMA | Agência europeia de medicamentos |
| EOF | Fluxo eletrosmótico |
| ER | Erro relativo |
| FAE | Fármacos Antiepilépticos |
| FCFRP | Faculdade de Ciências Farmacêuticas |
| FDA | Administração de drogas e alimentos |
| GBP | Gabapentina |
| GC | Cromatografia gasosa |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| ILAE | Liga internacional contra a epilepsia |
| IQSC | Instituto de Química de São Carlos |
| LIQ | Limite inferior de quantificação |
| LLE | Extração líquido-líquido |
| LSQ | Limite superior de quantificação |
| LTG | Lamotrigina |
| MS/MS | Espectrometria de massa sequencial |

| | |
|------|--|
| MTBE | Éter metil-terc-butílico |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| NPD | Detector de nitrogênio e fósforo |
| PHT | Fenobarbital |
| PI | Padrão interno |
| SPE | Extração em fase sólida |
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| TEA | Trietilamina |
| TPM | Topiramato |
| TT | Taxa de transferência |
| TTAB | Brometo de tetradeciltrimetilamônio |
| USP | Universidade de São Paulo |
| UTSA | Universidade do Texas San Antonio |
| VPA | Ácido valpróico |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Epilepsia..... | 1 |
| 1.2. Topiramato | 3 |
| 1.3. Fundamentos teóricos da técnica de eletroforese capilar | 5 |
| 1.4. Sistemas de detecção | 12 |
| 1.4.1. Detector DAD | 13 |
| 1.4.2. Detector C ⁴ D | 15 |
| 2. OBJETIVOS | 18 |
| 2.1. Objetivo geral | 18 |
| 2.2. Objetivos específicos | 18 |
| 3. MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS | 19 |
| 3.1. Análise do TPM por CE com detecção DAD e C ⁴ D..... | 19 |
| 3.1.1. Reagentes e solventes..... | 19 |
| 3.1.2. Equipamentos | 19 |
| 3.1.3. Capilar | 20 |
| 3.1.4. Solução padrão do TPM e padrão interno..... | 20 |
| 3.1.5. Avaliação das condições eletroforéticas..... | 21 |
| 3.2. Desenvolvimento e validação dos métodos com detecção DAD e C ⁴ D Lite para análise do TPM em plasma | 22 |
| 3.2.1. Material biológico..... | 22 |
| 3.2.2. Preparo das amostras | 22 |
| 3.2.3. Validação dos métodos | 24 |
| 3.2.3.1. Validação dos métodos utilizando detector DAD e C ⁴ D Lite | 25 |
| 3.2.3.2. Validação parcial do método com detector C ⁴ D comercial (EDAQ) ... | 29 |
| 3.3. Aplicação dos métodos desenvolvidos e validados para análise do TPM em amostras de plasma de pacientes em tratamento com TPM, empregando os detectores DAD e C ⁴ D comercial (EDAQ)..... | 30 |

| | |
|---|-----|
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 31 |
| 4.1. Análise do TPM por CE com detecção DAD e C ⁴ D Lite | 31 |
| 4.1.1. Capilar | 31 |
| 4.1.2. Avaliação das condições eletroforéticas..... | 32 |
| 4.2. Desenvolvimento e validação do método para análise do TPM em plasma por detecção indireta (DAD) e condutométrica (C ⁴ D Lite) | 42 |
| 4.2.1. Preparo das amostras | 42 |
| 4.2.2. Avaliação dos métodos..... | 444 |
| 4.2.2.1. Validação dos métodos utilizando detector DAD e C ⁴ D Lite | 44 |
| 4.2.2.2. Validação parcial do método com detecção condutométrica C ⁴ D comercial..... | 49 |
| 4.3. Aplicação dos métodos validados para a análise de amostras de plasma de pacientes em tratamento com TPM, empregando os detectores DAD e C ⁴ D comercial | 50 |
| 4.4. Comparação dos métodos desenvolvidos e validados com detectores DAD e C ⁴ D Lite | 54 |
| 5. CONCLUSÃO | 56 |
| REFERENCIAS..... | 57 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epilepsia

A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns atingindo cerca de 50 milhões de pessoas no mundo, sendo os maiores índices entre crianças e idosos (MAMENISKIENE; SAKALAUŠKAITE-JUODEIKIENE; BUDRYS, 2015). A prevalência da epilepsia no mundo é variável, mas se estimam 10 casos a cada 1000 habitantes. No Brasil a prevalência, considerando a população com epilepsia ativa (pelo menos uma crise nos últimos dois anos), é de 5,4 casos a cada 1000 habitantes (LI et al., 2007; NORONHA et al., 2007).

A principal característica da epilepsia é a predisposição a crises epiléticas transitórias e imprevisíveis com sintomas que são ocasionados devido à atividade anormal, excessiva e dessincronizada dos neurônios (FISHER et al., 2014). Essas crises podem afetar as funções motoras, sensoriais e/ou autônomas, a consciência, o estado emocional, a memória, a cognição e/ou comportamento. Entretanto, nem todos os tipos de crises afetam todas essas funções, mas influenciam em pelo menos uma delas (FISHER et al., 2005). As crises epiléticas podem ser classificadas em *i) focais*: crises que se originam em redes neuronais delimitada a um dos hemisférios cerebrais; *ii) generalizadas*: crises que são caracterizadas com o início rápido envolvendo redes neuronais distribuídas em ambos os hemisférios cerebrais e *iii) desconhecido*: quando as características apresentadas são insuficientes para se determinar o tipo de crise (BERG et al., 2010).

As causas de epilepsia podem ser classificadas em: genética (alteração genética conhecida ou presumida), estrutural/metabólica (alteração estrutural ou metabólica do cérebro), imunológica (inflamações cerebrais devido a doenças auto-imunes), infecciosas (causadas devido a doenças como tuberculose, malária, neurocisticercose, vírus da imunodeficiência adquirida (HIV)). (BERG et al., 2010; SCHEFFER et al., 2013).

Segundo o relatório oficial do *International League Against Epilepsy* (ILAE) elaborado por Fisher e colaboradores (2014) a epilepsia pode ser considerada uma doença cerebral a partir das seguintes condições: (1) ocorrência de duas crises não provocadas (ou reflexas) em um período superior a 24 horas, (2) ocorrência de uma

crise não provocada (ou reflexa) associada à probabilidade de pelo menos 60% de ocorrência de crises futuras, (3) diagnóstico de uma síndrome epiléptica (FISHER et al., 2014). A epilepsia pode ser considerada resolvida quando não há ocorrência de crises epiléticas por pelo menos 10 anos e durante os últimos cinco anos não tenha sido utilizado fármacos antiepiléticos (FAE). O termo "resolvida" é utilizado para definir que o indivíduo não tem mais a epilepsia, mas não descarta a probabilidade de reincidência das crises (FISHER et al., 2014).

O diagnóstico da epilepsia é imprescindível para a confirmação e caracterização do tipo de crise e síndrome epiléptica, sendo feita pela avaliação clínica detalhada como idade de início dos sintomas, evolução clínica e por exames complementares de eletroencefalograma, tomografia computadorizada e ressonância magnética (OGUNI, 2004; BERG et al., 2010).

A farmacoterapia com o uso de FAEs é o tratamento de escolha para o controle das crises epiléticas (MARQUES, 2015). E estes FAEs podem ser classificados em primeira, segunda e terceira geração. No Brasil estão disponíveis os de primeira geração representados por fenobarbital, fenitoína, primidona, etossuximida, carbamazepina, clonazepam e clobazam e os de segunda geração representados pela topiramato (TPM), lamotrigina, gabapentina, tiagabina, vigabatrina, oxycarbamazepina e pregabalina (VOHORA et al., 2010; BESAG; PATSALOS, 2012).

O principal objetivo do tratamento com FAE consiste em controlar completamente as crises epiléticas, mas sem o aparecimento de reações adversas, levando a melhora na qualidade de vida destas pessoas (PATSALOS et al., 2008).

Os FAEs normalmente são utilizados em monoterapia. Aproximadamente 60% dos pacientes têm suas crises controladas com o tratamento medicamentoso adequado (KWAN, BRODIE, 2000). A administração de mais de um FAE (politerapia) pode ser utilizado quando há falha terapêutica de pelo menos duas monoterapias sequenciais, o que favorece o aparecimento de reações adversas, mediante a possibilidade da ocorrência de interações medicamentosas. (REYNOLDS et al., 2002).

Entretanto, mesmo após a politerapia, o indivíduo pode apresentar crises epiléticas após um longo tempo de tratamento, sendo este diagnosticado com epilepsia refratária, também conhecida como epilepsia fármaco-resistente (KWAN; BRODIE, 2000; FREGNI; PASCUAL-LEONE; VALENTE, 2005). Apesar da

característica de fármaco-resistência, o tratamento para a epilepsia refratária são os FAEs de segunda geração, podendo estar em associação com os FAEs de primeira e terceira geração (KWAN; BRODIE, 2000).

Considerando a importância desta doença, a monitorização terapêutica dos pacientes é de grande relevância, principalmente para aqueles com epilepsia refratária, pois visa aperfeiçoar o tratamento farmacológico, obtendo melhor controle das crises com a menor incidência possível de reações adversas, além de avaliar a adesão ao tratamento e as interações entre os fármacos.

1.2. Topiramato

O TPM é um FAE de segunda geração, muito utilizado em crises parciais em adultos e crianças, síndrome de Lennox-Gaustaut, síndrome de West e epilepsia mioclônica juvenil, que pode compreender até 12% dos pacientes com epilepsia (FIGUEREDO, 1999; GARZON, 2002).

O TPM é um ácido fraco ($pK_a = 9,7$). Este fármaco é um sulfamato substituído do monossacarídeo D-frutose, quimicamente designado como 2,3:4,5-bis-O-(1-metiletilideno)- β -D-fructopiranosose sulfamato, possui fórmula molecular $C_{12}H_{21}NO_8S$, massa molecular de $339,36 \text{ g mol}^{-1}$, $\log P$ 2,15 e não apresenta grupos crómoforos (**Figura 1**) (SHANK et al., 2000).

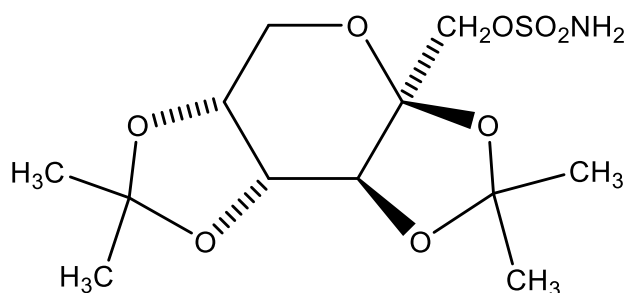


Figura 1. Estrutura química do TPM

Sua administração é por via oral e os comprimidos revestidos estão disponíveis nas doses de 25, 50 e 100 mg. A dose recomendada do TPM em monoterapia para adultos com crises parciais e crises tônico-clônicas é de 400 mg

por dia (ANVISA, 2014; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2014). Segundo Garzon (2002), podem ser utilizados até 1600 mg de TPM por dia, mas muitas pessoas apresentam efeitos colaterais relacionados à função cognitiva em doses acima de 600 mg. Em adultos, a dose mínima eficaz parece estar compreendida entre 200 a 400 mg por dia (GARZON, 2002) e o intervalo de concentração plásmicas pode variar de 5 - 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MANDRIOLI et al, 2010), devido à grande variabilidade individual.

O TPM apresenta farmacocinética linear e após a administração oral é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, atingindo em menos de 2 horas o pico de concentração plasmática máxima (C_{max}) de 7,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após administração de 400 mg do fármaco, e meia vida ($T_{1/2}$) de eliminação de 19 - 23 horas (ROSENFELD, 1997). A ligação às proteínas plasmáticas é pouco significativa e sua biodisponibilidade é em torno de 80%. Após ser metabolizado, o TPM é biotransformado pelo CYP450 sofrendo glucuronidação. Nenhum metabólito ativo é conhecido e grande parte do fármaco é excretado sem modificação pela urina (PATSALOS et al., 2002; MANDRIOLI et al., 2010).

As reações adversas mais comumente relatadas são efeitos sobre a cognição (lentidão psicomotora, problemas de memória, dificuldade de concentração), alterações comportamentais e psiquiátricas (depressão, ansiedade, nervosismo), tonturas, sonolência e insônia (GARZON, 2002, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2014).

O mecanismo de ação do TPM ainda não está bem elucidado, mas acredita-se que este bloqueia os canais de sódio voltagem-dependentes, aumenta a transmissão GABAérgica, atuando como antagonista dos receptores AMPA/cainato glutamatérgica, além de inibir a anidrase carbônica, que parece não ter relação com a atividade antiepiléptica (SHANK, et al., 2005).

Em relação à análise do TPM, alguns métodos já foram descritos na literatura (**Quadro 1**) usando técnicas de separação, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*), eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) e cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*). Estes métodos utilizam diferentes tipos de sistemas de detecção para quantificação do TPM, tais como ultravioleta (BAHRAMI et al, 2005; MANDRIOLI et al., 2010), fluorescência (MARTINC et al., 2014) espectrometria de massa sequencial (MS/MS, do inglês, *mass spectrometry/mass spectrometry*)

(PARK et al., 2008; SUBRAMANIAN; BIRNBAUM; REMMEL, 2008; KUMAR, 2013), detector de nitrogênio e fósforo (NPD, do inglês *nitrogen and phosphorus detector*) (HAHN et al., 2013), etc. Para o preparo de amostras, as principais técnicas descritas na literatura são a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid liquid extraction*) e extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*).

Quadro 1. Métodos para análise do TPM em amostras biológicas

| Autores | Técnica de análise | Detector | Tipo de extração | Matriz | Limite de quantificação |
|--------------------------|---------------------------|------------------|-------------------------|---------------|--------------------------------|
| Bahrami et al., 2005 | HPLC | UV/derivatização | LLE | Soro | 40 ng mL ⁻¹ |
| Park et al., 2008 | LC | MS/MS | LLE | Plasma | 20 ng mL ⁻¹ |
| Subramanian et al., 2008 | HPLC | MS | SPE | Plasma | 0,9 µg mL ⁻¹ |
| Mandrioli et al., 2010 | CE | UV/indireto | SPE | Plasma | 2 µg mL ⁻¹ |
| Martinc et al., 2014 | HPLC | Fluorescência | SPE | Plasma | 0,5 µg mL ⁻¹ |
| Hahn et al., 2013 | GC | NPD | SPE | Plasma | 1,0 µg mL ⁻¹ |
| Kumar, 2013 | LC | MS/MS | SPE | Plasma | 20,6 ng mL ⁻¹ |

1.3. Fundamentos teóricos da técnica de eletroforese capilar

A CE é uma técnica de alta eficiência para separação de espécies ionizadas ou passíveis de ionização a qual ocorre em um tubo capilar de sílica fundida, com diâmetro interno (DI) que pode variar entre 25 - 100 µm e comprimento de 50 a 100 cm, preenchido com eletrólito de corrida (BGE, do inglês *background electrolyte*). As extremidades deste capilar são inseridas em reservatórios contendo o BGE, enquanto uma diferença de potencial é aplicada aos eletrodos de platina (localizados ao lado de cada extremidade do capilar) conectados a uma fonte de alta tensão, tornando assim possível a separação dos analitos de acordo com as suas diferentes mobilidades eletroforéticas (TAVARES, 1997; MARCHI et al., 2007). A **Figura 2** representa o esquema do equipamento de CE.

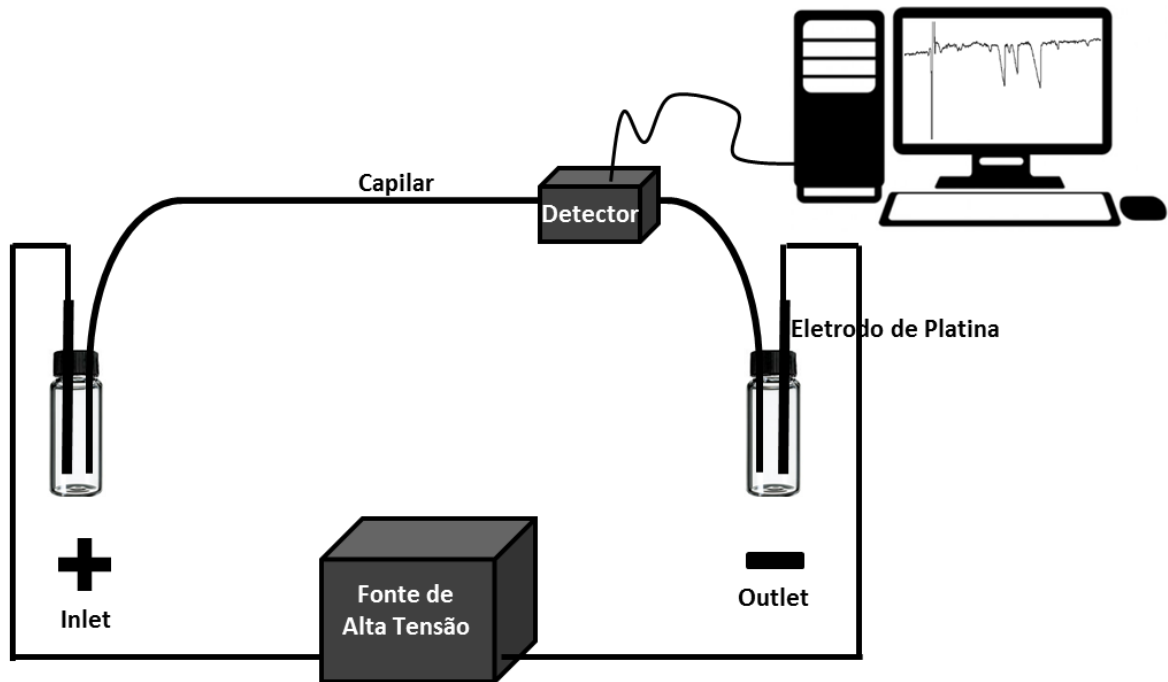


Figura 2. Esquema do equipamento de CE

Basicamente, a seletividade em CE é obtida pela diferença na mobilidade entre os solutos, que é dependente da sua carga, do seu tamanho e da viscosidade do meio (BOONE et al., 1999), sendo a mobilidade eletroforética (μ_{ef}) expressa pela

Equação 1:

$$\mu_{ef} = \left(\frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \right) \quad \text{(Equação 1)}$$

onde q = carga do íon;

η = viscosidade da solução;

r = raio iônico hidratado.

A velocidade eletroforética (v_{ef}) de cada íon é dada sob a influência de uma tensão aplicada e é determinada pela **Equação 2** (WEINBERGER, 2000):

$$v_{ef} = \mu_{ef} \cdot E \quad \text{(Equação 2)}$$

onde V_{ef} = velocidade do íon;

μ_e = mobilidade eletroforética;

E = campo elétrico (V/m).

Portanto, quanto maior o campo elétrico aplicado, maior será a velocidade de migração do íon no interior do capilar (SUNTORNUSUK, 2007). Os capilares usados em CE são, em sua grande maioria, de sílica fundida. Sendo assim, as paredes dos capilares utilizados em CE possuem grupos silanóis (SiOH); os quais, em média, apresentam um caráter ácido. Em condições de pH alto (acima de 7,0), estes grupos silanóis se ionizam (SiO⁻), resultando em uma superfície carregada negativamente.

Os cátions presentes no BGE se aproximam dos grupos silanóis ionizados negativamente formando uma dupla camada elétrica (**Figura 3**). A parte mais próxima à parede do capilar, formada pelas fortes interações eletrostáticas entre os cátions do BGE e os ânions da parede do capilar, é denominada camada estática ou fixa. A parte mais distante da parede do capilar é chamada de camada difusa ou móvel (WEINBERGER, 2000; QUEIROZ, JARDIM, 2005).

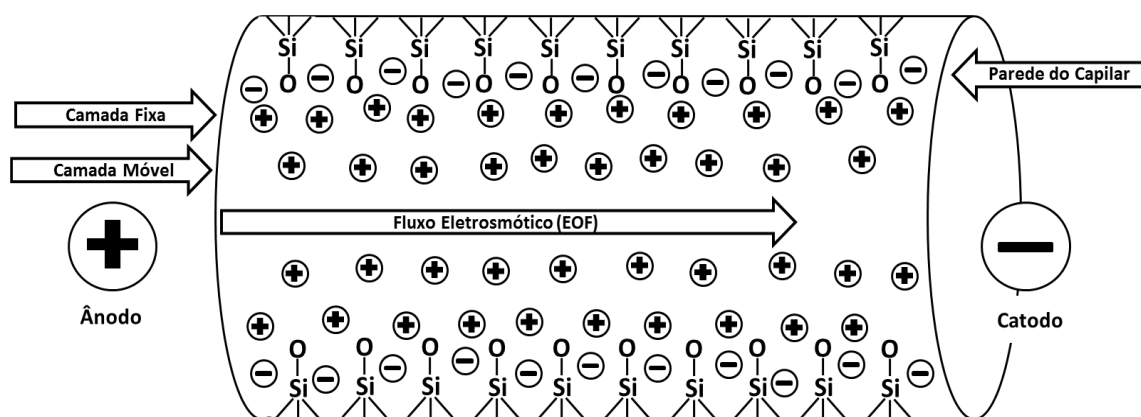


Figura 3. Representação da formação da dupla camada no interior do capilar

Quando a diferença de potencial é aplicada, as cargas presentes na camada difusa, solvatadas com moléculas de água, geram um fluxo em direção ao eletrodo de carga oposta. Este fluxo é denominado fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *electroosmotic flow*) (TAVARES, 1997; WEINBERGER, 2000; MARCHI et al., 2007). A magnitude do EOF pode ser expressa em termos de velocidade ou mobilidade, segundo a **Equação 3** e **4**, e está relacionada à viscosidade do meio, à constante

dielétrica da solução de eletrólitos e ao potencial zeta (ALTRIA, 1996; WEINBERGER, 2000; WANG, 2007).

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon \xi}{\eta} \quad \text{(Equação 3)}$$

$$V_{eof} = \mu_{eof} \cdot E \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde μ_{eof} = mobilidade do EOF;

ε = constante dielétrica;

ξ = potencial zeta;

η = viscosidade;

V_{eof} = velocidade do EOF.

A magnitude do EOF é altamente dependente do pH da solução de eletrólitos, uma vez que o potencial zeta é governado pela ionização dos grupos silanóis. Em pH abaixo de 4, a ionização dos grupos silanóis é pequena e o EOF é pouco significativo, enquanto que acima de pH 9, os silanóis ficam completamente ionizados e o EOF é intenso. A presença do EOF permite a separação e detecção de cátions e ânions em uma única análise. Em pH acima de 7,0 o EOF é suficientemente forte, conseguindo assim, arrastar ânions para o cátodo independente da mobilidade dos mesmos (ALTRIA, 1996; WEINBERGER, 2000).

Uma característica singular do EOF no capilar é o perfil de velocidade linear ou planar, pois a velocidade uniforme dos solutos através do capilar causa menor dispersão da amostra, aumentando a eficiência da análise (WEINBERGER, 2000). Isto difere do fluxo gerado por uma bomba externa, como nos sistemas cromatográficos, que produz um perfil parabólico de velocidade correspondente ao regime laminar de fluxo, o que pode ocasionar o alargamento de bandas (WEINBERGER, 2000) (**Figura 4**).

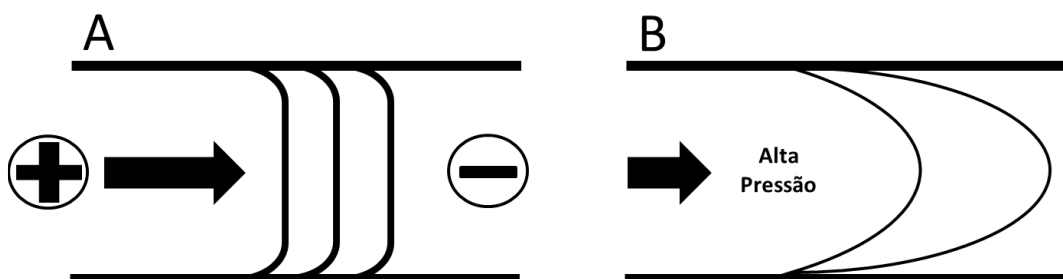


Figura 4. Perfil do fluxo planar (A) e parabólico (B) (Adaptado de WEINBERGER, 2000)

A mobilidade aparente (μ_a) de um íon é a soma da mobilidade eletroforética (μ_e) e do EOF (μ_{eof}) da solução, conforme representada pela **Equação 5**:

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{eof} \quad \text{(Equação 5)}$$

Na eletroforese capilar são possíveis dois modos de análise quanto ao EOF: o modo coeletrosmótico, onde os analitos migram no mesmo sentido que o EOF e o modo contraeletrosmótico, onde os analitos migram no sentido contrário ao EOF (**Figura 5**).

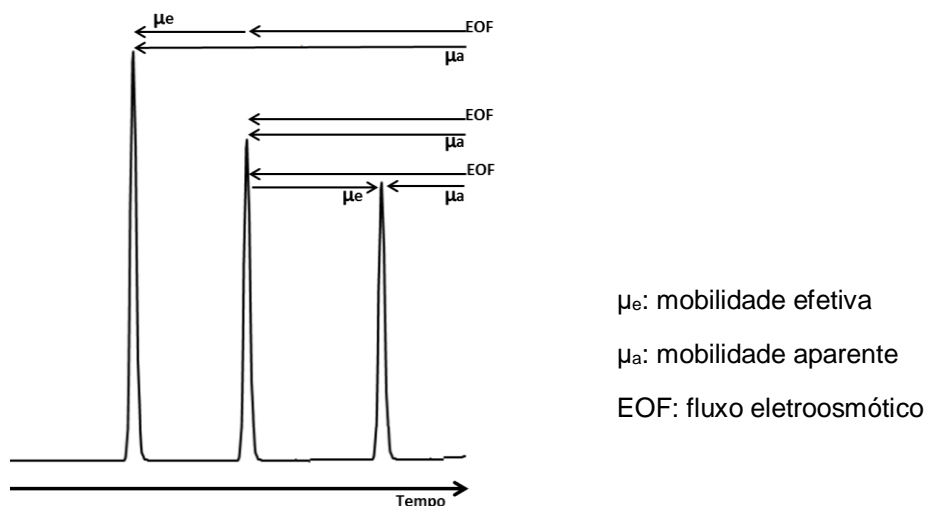


Figura 5. Mobilidade coeletrosmótico e contraeletrosmótico (adaptado de <https://www.chem.agilent.com>)

Em análise de ânions empregando capilar de sílica fundida com parede interna não recoberta, o EOF migra em direção ao cátodo enquanto que os ânions migram em direção ao ânodo. A determinação da mobilidade aparente destes ânions

depende de qual mobilidade é predominante (DOBLE; MACKA; HADDAD, 2000). Em casos onde o ânion apresente mobilidade eletroforética superior ao EOF, este migrará em direção ao ânodo e não será arrastado ao cátodo pelo EOF. Esta situação é favorecida quando o EOF é suprimido empregando baixos valores de pH ($\text{pH} < 3$). Para possibilitar a análise destes ânions, deve ser empregado o modo polaridade reversa, ou ainda o modo polaridade normal com a injeção da amostra realizada no *outlet* (DOBLE; MACKA; HADDAD, 2000). A análise de ânions também pode ser realizada em modo polaridade normal com o EOF superior à mobilidade eletroforética. Neste caso, o EOF é favorecido empregando alto valor de pH ($\text{pH} > 8$) e, ainda que os ânions se movimentem em direção ao ânodo, estes serão arrastados pelo EOF (DOBLE; MACKA; HADDAD, 2000).

Outra maneira de realizar a análise de ânions é invertendo o sentido do EOF empregando um tensoativo catiônico, o que permite a análise no modo coeletrosmótico, onde os analitos e o EOF migram em direção ao ânodo, e desta forma, deve-se optar por trabalhar no modo polaridade reversa. Para promover a inversão do EOF, os tensoativos catiônicos mais utilizados são: brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB) e brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB) (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO 1997; DOBLE; MACKA; HADDAD, 2000; MARCHI et al., 2007).

A inversão do fluxo ocorre através da formação de uma camada de semi-micela na parede interna do capilar. A sequência de modificações estruturais da semi-micela pode ser observada na **Figura 6**.

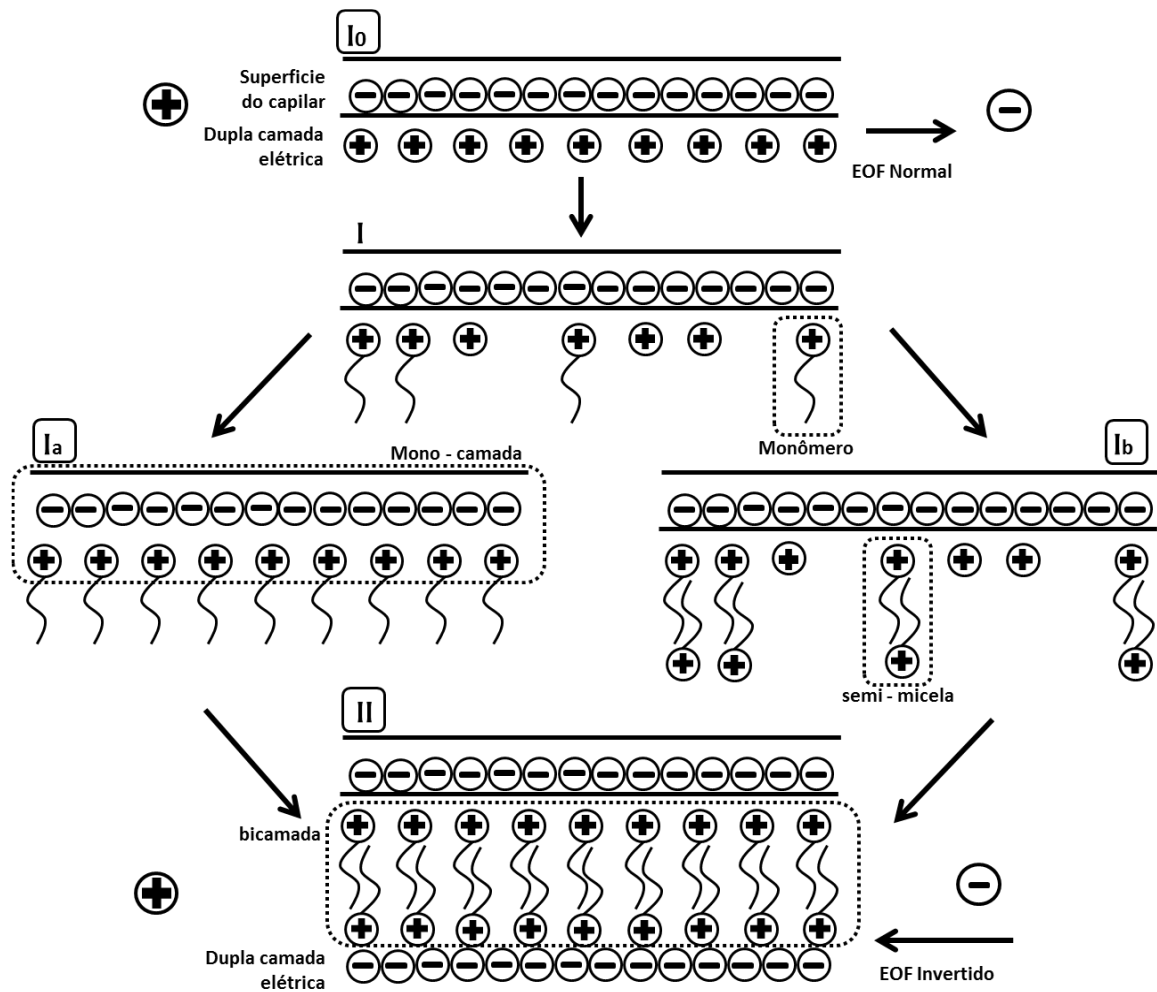


Figura 6. Representação esquemática da formação de subcamadas do tensoativo catiônico e da migração de ânions sob EOF invertido (adaptado de: COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997)

A estrutura I_0 representa a situação de EOF normal, no qual a superfície está negativamente carregada e os cátions, na proximidade da superfície, estão arranjados de acordo com uma dupla camada elétrica. Com a adição do tensoativo catiônico ao BGE, uma pequena quantidade de monômeros do tensoativo desloca os cátions da dupla camada e são adsorvidos na superfície (estrutura I). As forças que governam a adsorção nesta etapa são de caráter coulômbico eletrostática e atuam entre os sítios de carga negativa da superfície e as cabeças dos monômeros carregadas positivamente (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997).

Quando a concentração do tensoativo adicionado ao BGE aumenta, podem ocorrer dois fenômenos. Em um deles, a adsorção dos monômeros prossegue, e eventualmente, alcança um ponto no qual todos os sítios de cargas da superfície são completamente neutralizados, como ilustrado na estrutura I_a . Este estágio

caracteriza a formação de uma monocamada, na qual a cabeça dos monômeros carregada positivamente está firmemente ligada à superfície negativa e a cauda voltada para a solução (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997). Com este arranjo não há carga efetiva na superfície e o EOF é suprimido. Alternativamente, uma rota secundária pode ser visualizada, onde a adsorção de semi-micelas prevalece, levando à estrutura I_b. As semi-micelas são formadas devido às interações de dispersão (forças de London) entre as caudas dos monômeros do tensoativo. O aumento na concentração do tensoativo na solução aumenta a possibilidade de interações coesivas entre as caudas, convertendo ambas as estruturas (I_a e I_b) na estrutura II, que representa a bicamada de ânions, que ao ser submetida a um campo elétrico, faz com que o EOF migre para o ânodo. Assim, com a inversão do fluxo seguido da inversão de polaridade, tanto o EOF como o ânion migram para o mesmo sentido, possibilitando análises mais rápidas e aumento da eficiência devido a menor dispersão longitudinal (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997; KLOCKOW-Beck et al., 1998).

1.4. Sistemas de detecção

Uma das grandes versatilidades da CE é a possibilidade de utilizar diversos detectores. (SANTOS, TAVARES, 2000). A escolha do detector mais adequado dependerá das características do analito, da seletividade e faixa linear do detector, do limite de quantificação desejado, etc (FRANCISCO et al., 2010). O **Quadro 2** apresenta uma comparação entre os sistemas de detecção usados em eletroforese capilar (TAVARES, 1996).

Quadro 2: Comparação entre alguns sistemas de detecção usados em eletroforese capilar.

| MODO DE DETECÇÃO | LIMITES DE DETECÇÃO TÍPICO (MOL/L) |
|---|--|
| ÍNDICE DE REFRAÇÃO Direto (laser) | $10^{-5} - 10^{-6}$ |
| CONDUTIVIDADE | $10^{-5} - 10^{-6}$ |
| ABSORBÂNCIA Direto Indireto | $10^{-5} - 10^{-6}$ $10^{-4} - 10^{-6}$ |
| FLUORESCÊNCIA Direto (lâmpada) Direto (laser) Indireto | $10^{-7} - 10^{-8}$ $10^{-9} - 10^{-12}$ $10^{-6} - 10^{-7}$ |
| ESPECTROMETRIA DE MASSAS | $10^{-4} - 10^{-9}$ |
| AMPEROMETRIA | $10^{-8} - 10^{-9}$ |
| RADIOMETRIA | $10^{-9} - 10^{-11}$ |
| RAMAN | $10^{-6} - 10^{-7}$ |

Os detectores em CE podem ser classificados de acordo com suas características em: ópticos (fotométrico de onda fixa, espectrofotométrico de onda variável, espectrofotométrico por arranjo diodos (DAD, do inglês *diode array detector*), infravermelho, fluorescência, etc), eletroquímicos (amperométricos, voltamétricos, condutométricos (condutométrico sem contato capacitivamente acoplado (C⁴D, do inglês *capacitively coupled contactless conductivity detection*), e acoplados (espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, etc). Os métodos de detecção podem ser classificados também de acordo com a seletividade, podendo ser seletivos (respondem a uma certa propriedade do analito) ou universais (respondem a diferença de uma certa propriedade entre o analito e o BGE) (FRACASSI, 2001; FRANCISCO et al, 2000).

A seguir serão descritos detalhadamente os dois tipos de detectores utilizados neste trabalho: o detector seletivo (DAD) e o detector universal (C⁴D).

1.4.1. Detector DAD

A detecção espectrofotométrica na região do UV-Vis é uma das mais utilizadas em CE, pois a maioria dos compostos estudados apresenta absorção na região de 200-780 nm. Esta detecção é normalmente designada de modo direto e os

analitos para serem detectados devem ter grupos cromóforos que absorvam energia nesta região (JAGER, TAVARES, 2001). A **Figura 7** apresenta um desenho do equipamento de CE com detector DAD.

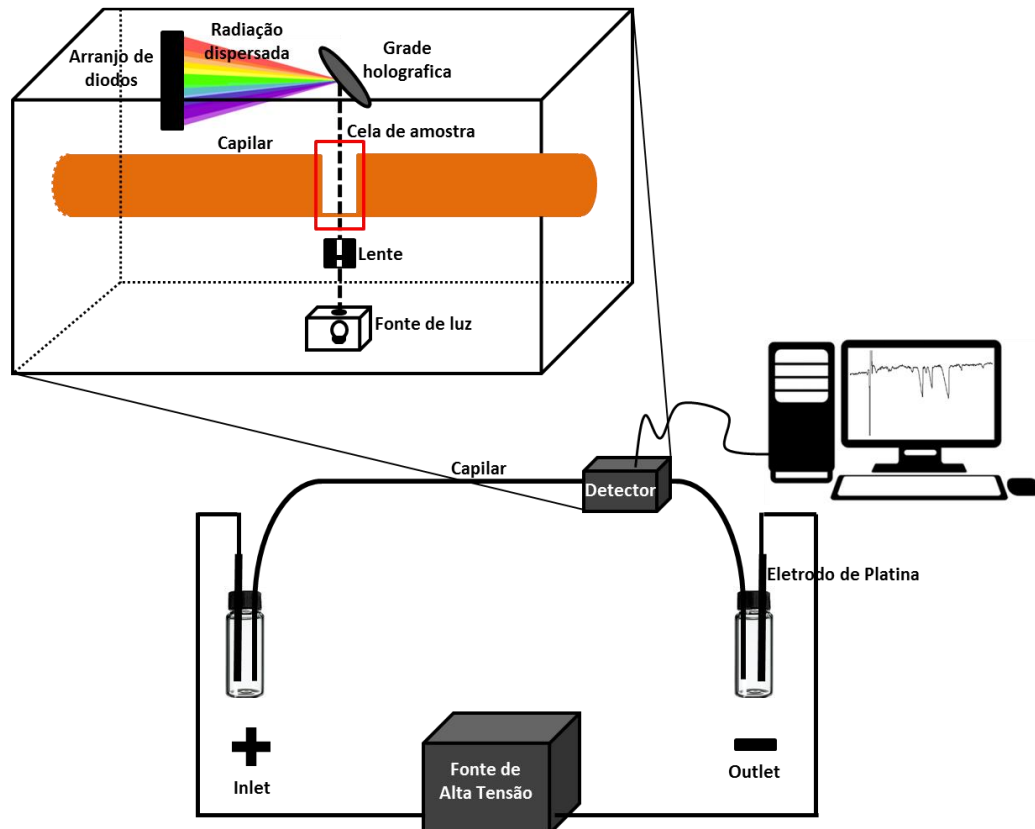


Figura 7. Equipamento de CE com detector DAD

A detecção de analitos que não possuem grupos cromóforos ou que absorvem pouco na região do UV-Vis pode ser feita por derivatização da molécula (inclusão de grupos cromóforos na estrutura do analito) (BAHRAMI et al., 2005) ou por detecção em modo indireto (MANDRIOLI et al., 2010). Na detecção em modo indireto, um coíon que possui grupo cromóforo (com mobilidade semelhante ao do analito) é adicionado ao BGE, gerando um sinal de fundo elevado chamado de *probe* (DOBLE; HADDAD, 1999; COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997). O deslocamento do *probe* pelo íon do analito leva a um decréscimo quantificável na absorbância do BGE, registrado como um pico negativo (JAGER; TAVARES, 2001; DOBLE; HADDAD, 1999). A escolha do *probe* leva em consideração sua mobilidade, suas propriedades espectrofotométricas e físico-químicas. A sua mobilidade e

concentração são cruciais para o perfil de separação do método (DOBLE; HADDAD, 1999).

Para se obter sinais analíticos mais nítidos e simétricos, com menor limite de detecção possível, devem ser aplicadas as seguintes condições (DOBLE; HADDAD, 1999):

- i) O valor da mobilidade eletroforética do *probe* adicionado ao BGE deverá ser próximo ao do composto analisado,
- ii) A absorvidade molar do *probe* deverá ser alta para obter maior sensibilidade de detecção.

Os *probes* mais utilizados são os cromatos, carboxilatos aromáticos, sulfonatos aromáticos, misturas de *probes* e *probes* específicos para detecção por fluorescência indireta (DOBLE; HADDAD, 1999). O grau de deslocamento do *probe* pelos íons em análise é conhecido como taxa de transferência (TT). A TT é definida como o número de mol do *probe* que é deslocado por um mol do íon analítico. Como a resposta do detector é proporcional à TT, quanto maior o valor de TT, maior a resposta do detector (DOBLE; HADDAD, 1999).

1.4.2. Detector C⁴D

A detecção C⁴D aplicada à eletroforese capilar foi introduzida em 1998, de forma independente, por Zemmann e colaboradores (ZEMANN et al., 1998) e da Silva e do Lago (da SILVA; do LAGO; 1998). Desde sua introdução, principalmente pela versatilidade oferecida, vem ganhando destaque em laboratórios de pesquisa e sendo aplicado a diversas classes de compostos e nas mais variadas matrizes (KUBÁN; HAUSER; 2008).

Atualmente dois modelos comerciais desse detector estão disponíveis no mercado: o da EDAQ (<http://www.edaq.com/c4d-contactless-conductivity-detector>) e da ISTECH (http://www.istech.at/ce_unit.htm). Além dos modelos comerciais, existe o modelo *lab-made*, denominado C⁴D Lite, cuja versão *open hardware* (*open capacitively coupled contactless conductivity detector-Open C⁴D*), com tutorial para construção e software para operar e realizar aquisição de sinal, é oferecida pelo grupo do professor do Lago. Além do custo reduzido, o detector C⁴D Lite foi projetado para operar em faixa de frequência e amplitude de sinal compatível com a maioria dos eletrólitos usados em CE, dispensando as demoradas adequações

(frequência e amplitude) necessárias para o bom funcionamento dos detectores comerciais a cada alteração no método (p.ex., DI do capilar, BGE, concentração do BGE, etc.) (FRANCISCO, 2010). A **Figura 8** mostra os 2 detectores utilizados neste trabalho, o C⁴D Lite (**8a**) e o detector C4D comercial da Edaq (**8b**).

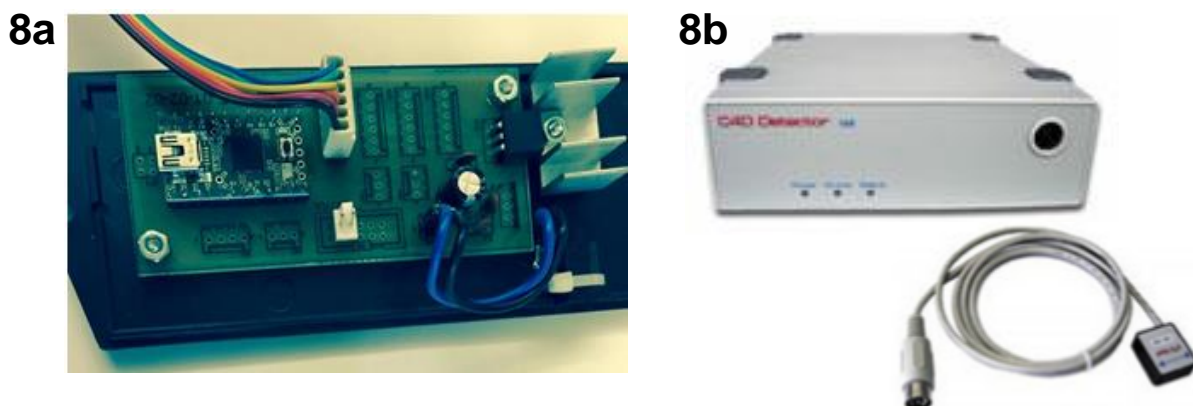


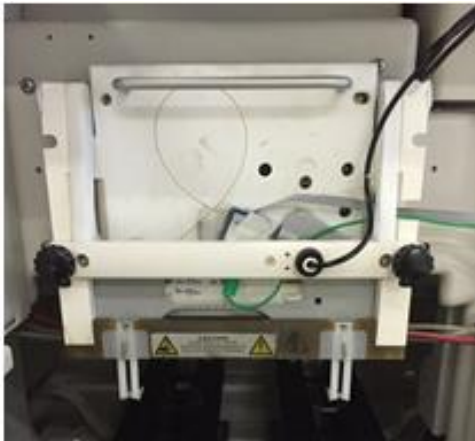
Figura 8. Detectores C⁴D Lite (8a) e detector comercial da Edaq (8b) (<http://www.edaq.com/c4d-contactless-conductivity-detector>; Open Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector – OpenC4D. 2011)

O acoplamento dos dois detectores no equipamento de CE é demonstrado pela **Figura 9a**. A **Figura 9b** demonstra como os dois eletrodos são posicionados do lado externo do capilar; entre estes eletrodos há uma distância definida (~1 mm) onde um sinal alternado é aplicado no primeiro eletrodo (emissor) e transmitido através da superfície do capilar e da solução no interior do capilar, até chegar ao segundo eletrodo (coletor), que é usado para detectar o sinal (FRANCISCO, 2010).

Como a resistência à passagem do sinal oferecida pela superfície do capilar (reatância) se mantém constante, a variação no sinal detectada pelo eletrodo coletor é correspondente à variação da resistência (ou condutância) da solução no interior do capilar. A condutância de uma solução (G) é dependente da área do eletrodo (A), da distância entre os eletrodos (l), das concentrações de todas as espécies carregadas (C_i) e da condutividade molar de cada espécie (λ_i), de acordo com a **Equação 6** (CARVALHO *et al.*, 2009):

$$G = \frac{A}{l} \cdot \sum \lambda_i \cdot C_i \quad \text{(Equação 6)}$$

9a



9b

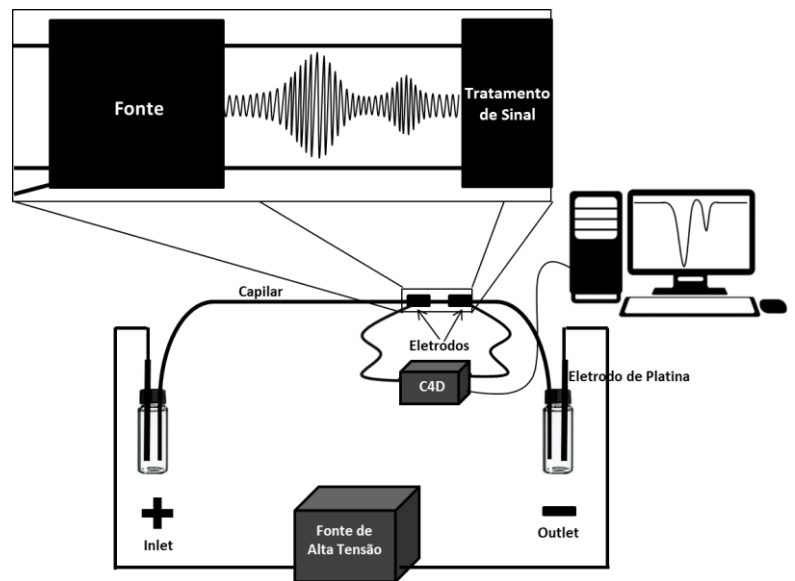


Figura 9. Detectores C⁴D acoplado ao equipamento de CE (9a) e figura esquemática do equipamento de CE com detectores C⁴D (9b)

Devido à robustez, mínima demanda por manutenção e baixo custo, a popularidade do detector C⁴D está em constante crescimento (KUBAN; HAUSER, 2008) despertando o interesse pela aplicação em métodos bioanalíticos de rotina. Assim o objetivo deste trabalho foi desenvolver dois métodos eletroforéticos utilizando os sistemas de detecção C⁴D e DAD para análise de TPM em material biológico para monitorização terapêutica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar dois métodos bioanálíticos por CE, utilizando o detector DAD (em modo indireto) e o detector C⁴D, para analisar o TPM em amostras de plasma de pacientes portadores de epilepsia refratária em tratamento no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP).

2.2. Objetivos específicos

- Selecionar as condições para análise do TPM por CE-DAD;
- Selecionar as condições para análise do TPM por CE-C⁴D Lite;
- Desenvolver um método de preparo de amostra por LLE para análise do TPM em amostras de plasma utilizando os detectores DAD e C⁴D Lite;
- Validar os métodos desenvolvidos;
- Aplicar os métodos desenvolvidos e validados para análise do TPM em amostras de plasmas de pacientes em tratamento no HCFMRP/USP;
- Comparar os dois métodos.

3. MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Análise do TPM por CE com detecção DAD e C⁴D

3.1.1. Reagentes e solventes

Todos os reagentes e solventes empregados para o desenvolvimento e validação dos métodos foram grau analítico ou HPLC. Foram utilizados: hidróxido de sódio (NaOH) (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA), 3,5 ácido dinitrobenzóico (DNB) (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA), trietilamina (TEA) (J.T Baker, Phillipsburg, EUA), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA) e 2-amino-2-hidrometil-propano-1,3-diol (TRIS) (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA). Os solventes usados foram: acetona (Mallinckrodt, Paris, EUA), metanol (MeOH) (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA), etanol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA), éter de petróleo (J.T Baker, Phillipsburg, EUA), acetato de etila (J.T Baker, Phillipsburg, EUA) e éter metil-terc-butílico (MTBE) (J.T Baker, Phillipsburg, EUA)

3.1.2. Equipamentos

O método com detector DAD foi desenvolvido, validado e aplicado em amostras de pacientes empregando um equipamento de CE modelo P/ACE™ MDQ da Beckman Coulter (Fullerton, EUA), equipado com detector DAD operando em 254 nm. O método com detecção C⁴D foi desenvolvido e validado utilizado um equipamento de CE, do mesmo modelo citado anteriormente, adaptado com detector C⁴D Lite. Para a aplicação do método em amostras de pacientes tratados com TPM foi usado um equipamento de CE (mesmo modelo), porém equipado com detector C⁴D comercial modelo ER 125 (EDAQ, Denistone, Austrália). Para o controle, aquisição e tratamento dos dados foi utilizado o *software* 32 Karat™ versão 8.0.

A pesagem dos reagentes e padrões analíticos foi realizada em balança analítica modelo CP225D (Sartorius, Goettingen, Alemanha). As medidas de pH foram realizadas com eletrodo ANALION e potenciostato modelo PHS-3B (PHTEK, Curitiba, Brasil). A água ultrapura empregada em todos os experimentos foi obtida a partir do sistema de purificação Direct Q3 (Millipore, Bedford, EUA), com

resistividade específica de $18,2 \Omega \text{ cm}$ a 25°C . Para a degaseificação das soluções foi utilizado um aparelho de ultrassom modelo Q3350 (Quimis, Diadema, Brasil). Todas as soluções aquosas foram filtradas utilizando filtros Millex-HV, com membranas de tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore, Massachusetts, EUA).

Para agitação e centrifugação das amostras foram utilizados *vortex* modelo Lab dancer (IKA, Breisgau, Alemanha) e centrífuga modelo 206 (Fanem, São Paulo, Brasil).

3.1.3. Capilar

Para ambos os métodos foram utilizados capilares de sílica fundida revestido externamente com poliimida (Polymicro, Phoenix, EUA), com $75 \mu\text{m}$ de DI, 52 cm de comprimento total (C_{tot}) e 40 cm de comprimento efetivo (C_{ef}). A janela óptica necessária para as análises utilizando o detector DAD foi feita removendo uma pequena região ($\approx 0,5 \text{ cm}$ de comprimento) aproximadamente 11 cm antes de uma das extremidades do capilar através da aplicação de calor. A poliimida queimada foi removida com auxílio de um algodão embebido em acetona.

Antes do primeiro uso, os capilares foram condicionados por lavagem com solução de $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$ durante 30 minutos, seguido de água ultrapura durante 30 minutos. No início de cada dia, o capilar foi condicionado com solução de $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, seguido por uma etapa de lavagem com água ultrapura e uma terceira etapa com o BGE, todas as etapas com duração de 10 minutos cada. Entre as corridas o capilar foi condicionado com MeOH e BGE, com duração de 2 minutos cada. Todos estes processos de lavagem foram feitos sob pressão hidrodinâmica a 20 psi. Ao final das análises, o capilar era lavado com solução de $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ durante 10 minutos, seguido por lavagem com água ultrapura por igual período de tempo. Durante o armazenamento, as extremidades do capilar permaneceram imersas em *vials* contendo água ultrapura.

3.1.4. Solução padrão do TPM e padrão interno

O padrão analítico do TPM (grau de pureza $\geq 98\%$) foi obtido da Toronto *Research Chemicals Inc* (Toronto, Canadá). A partir deste padrão foi preparada uma solução, em MeOH , na concentração de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para a otimização e

validação dos métodos, foram preparadas soluções de trabalho a partir da solução estoque, nas concentrações de 20, 40, 100, 200, 500 e 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o método desenvolvido por detecção DAD e 8, 16, 40, 80, 200 e 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o método por detecção C⁴D.

A escolha do padrão interno (PI) foi feita a partir de soluções estoques em metanol na concentração de 1 mg mL^{-1} de diferentes substâncias avaliadas para cada método. Para a detecção DAD foram avaliados como PI: terbutalina, aspartato, glicina, glutamato, alendronato de sódio, ϵ -ácido n-amino caprótico, ácido caprótico, ácido butírico, acetamida e propionamida, todos na concentração de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para a detecção C⁴D foram avaliados o 2-naftol β e o fenol, na concentração de 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todos estes padrões foram adquiridos da Sigma Aldrich (Missouri, EUA) com grau de pureza $\geq 98\%$.

3.1.5. Avaliação das condições eletroforéticas

As condições de análises foram definidas transferindo-se 25 μL de solução de TPM, nas concentrações de 200 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para detecção DAD e C⁴D, respectivamente, para tubos cônicos de vidro, o solvente evaporado sob fluxo de ar comprimido e os resíduos foram redissolvidos em 100 μL de água ultrapura, seguido de agitação em *vortex* por 10 segundos e análise por CE. Em ambos os métodos as amostras foram introduzidas no capilar aplicando pressão hidrodinâmica de 0,8 psi durante 5 segundos no reservatório da amostra.

Para o método com detecção DAD foi avaliado o BGE composto por TEA nas concentrações de 10, 15, 20 e 25 mmol L^{-1} , o inversor de fluxo CTAB nas concentrações de 0,2; 0,3; 0,4; e 0,5 mmol L^{-1} e o *probe* DNB nas concentrações de 2, 3, 4 e 5 mmol L^{-1} . As temperaturas de análise de 25, 30 e 35 $^{\circ}\text{C}$ também foram avaliadas.

Para definir as condições experimentais do método com detecção C⁴D Lite, foi avaliada solução de TEA diluída em água ultrapura nas concentrações de 10, 15 e 20 mmol L^{-1} como BGE.

Para avaliar a eletrólise das soluções de BGE, 15 injeções de uma solução de TPM de concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram injetadas no equipamento utilizando o BGE otimizado para cada método (DAD e C⁴D Lite). Além disso, também foi avaliada a

influência da tensão aplicada para separação (5, 10, 15, 20, 25 e 30 kV) em ambos os métodos (DAD e C⁴D Lite)

3.2. Desenvolvimento e validação dos métodos com detecção DAD e C⁴D Lite para análise do TPM em plasma

O método com detecção DAD foi desenvolvido e validado no Instituto de química de São Carlos, Universidade de São Paulo (ICSC/USP), sob orientação do Prof. Dr. Emanuel Carrilho e o método com detecção C⁴D Lite foi desenvolvido e validado no Departamento de Química da Universidade do Texas em San Antonio (UTSA), sob supervisão do Prof. Dr. Carlos Garcia.

3.2.1. Material biológico

Para o método com detecção DAD, as amostras de plasma branco (isento do fármaco de interesse) e de plasma de pacientes tratados com TPM foram obtidas do Centro de Pesquisa em Assistência Farmacêutica e Farmácia Clínica (CPAFF) em um projeto em colaboração intitulado “Avaliação clínica e monitorização terapêutica do topiramato em pacientes com epilepsia refratária” sob coordenação do Prof. Dr. Leonardo Regis Leira Pereira. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o projeto acima referido foram submetidos aos Comitês de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFRP/USP) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) sendo aprovados em 24/04/2014 (processo: 030/2014) pela FCFPR/USP e em 30/05/2014 pela FMRP/USP.

Para o método com detecção C⁴D o plasma humano liofilizado (branco) foi adquirido da empresa Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA). O plasma de pacientes em tratamento com TPM foram os mesmos utilizados na aplicação do método com detecção DAD.

3.2.2. Preparo das amostras

Como procedimento de preparo das amostras, foi utilizada a técnica de LLE, um procedimento simples, baseado na partição do analito entre duas fases

imiscíveis: fase orgânica e fase aquosa (QUEIROZ, COLLINS, JARDIM, 2001). Para avaliar este procedimento de extração foram testados os solventes orgânicos acetato de etila, éter de petróleo e MTBE.

No método com detecção DAD, as amostras foram preparadas pela adição de 25 μL da solução padrão de TPM ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) em tubos de extração. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e em seguida foram adicionados 500 μL de plasma branco, 150 μL de solução tampão TRIS pH 8,2 e 2 mL do solvente extrator. Os tubos foram agitados em *vortex* por 30 segundos e em seguida centrifugados a 1800 g por 5 minutos. A fase orgânica (1,5 mL) foi recuperada e transferida para um tubo de fundo cônico e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram ressuspensos em 100 μL de água ultrapura, agitados em *vortex* por 15 segundos e em seguida realizada a análise eletroforética.

Para o preparo de amostra do método com detecção C⁴D, foi utilizada a mesma técnica de extração, porém a quantidade de plasma utilizada foi de 200 μL . Para isto, 25 μL da solução padrão de TPM ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 25 μL da solução padrão de PI ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram transferidos para tubos de extração. O solvente foi completamente evaporado sob fluxo de ar comprimido e, em seguida, foram adicionados 200 μL de plasma branco, 60 μL solução de tampão TRIS pH 8,2 e 800 μL do solvente extrator. Os tubos foram agitados em *vortex* por 30 s e centrifugados a 1800 g por 5 minutos. A fase orgânica (600 μL) foi recuperada e transferida para tubos de fundo cônico e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram ressuspensos em 100 μL de água ultrapura, agitados em *vortex* por 15 segundos e em seguida realizada a análise eletroforética. A porcentagem de recuperação foi calculada comparando-se áreas obtidas da solução padrão de TPM com as amostras submetidas à extração, corrigidas de acordo com o volume coletado. A **Figura 10** apresenta o fluxograma dos procedimentos de preparo das amostras para ambos os métodos.

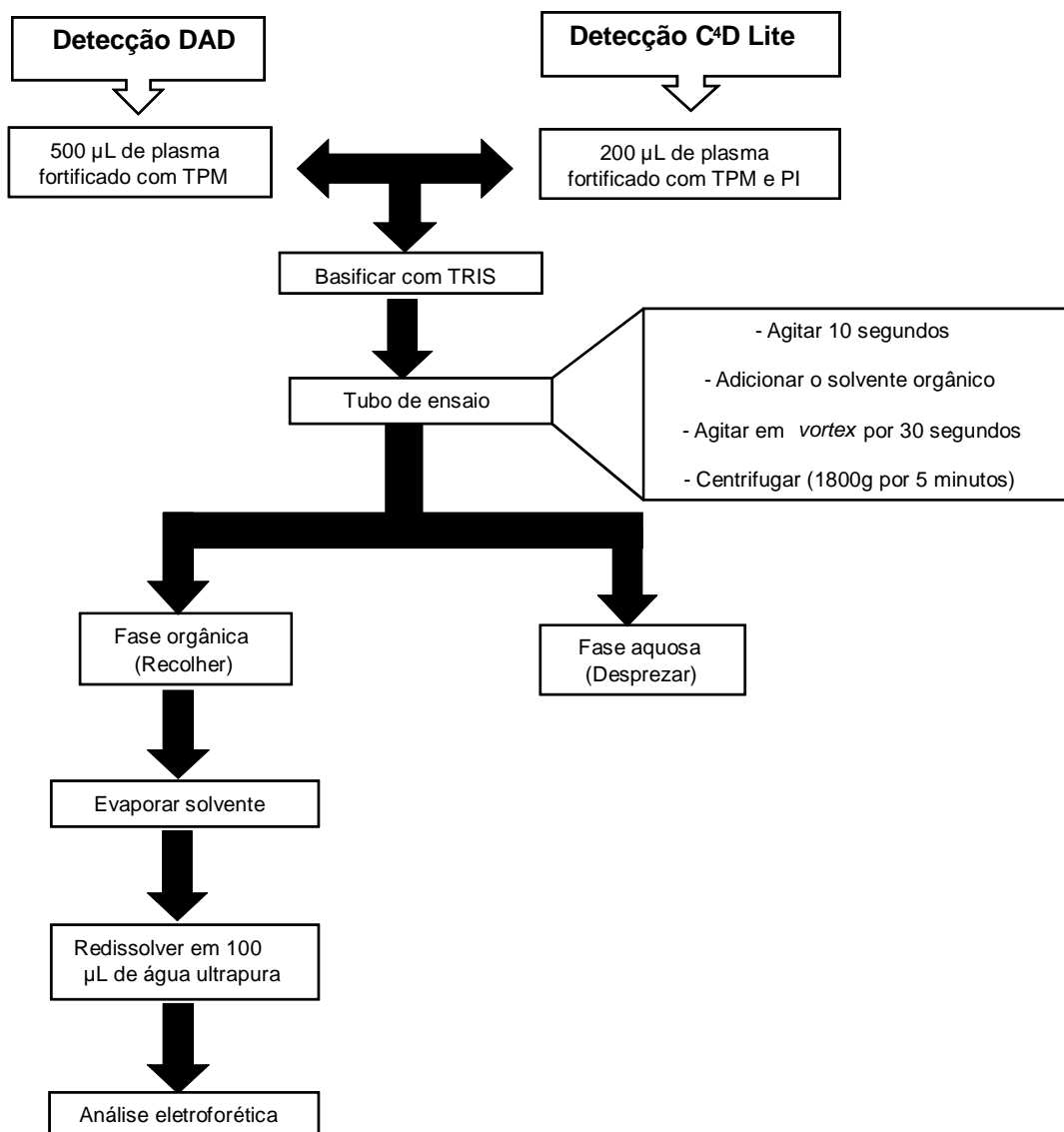


Figura 10. Fluxograma do procedimento de extração por LLE para análise do TPM em amostras de plasma utilizando detecção indireta e condutométrica

3.2.3. Validação dos métodos

A validação dos métodos bioanalíticos seguiu as recomendações contidas na resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA, e nas diretrizes para validação de métodos bioanalíticos (*Guidelines on bioanalytical method validation*), de 21 de junho de 2011 da EMA (*European Medicine Agency*), contemplando os parâmetros de: seletividade, efeito residual, limite inferior de quantificação (LIQ), linearidade, precisão, exatidão e estabilidade.

3.2.3.1. Validação dos métodos utilizando detector DAD e C⁴D Lite

➤ Seletividade

Este parâmetro foi avaliado para verificar a interferência de possíveis impurezas, produtos de decomposição, metabólitos, medicamentos e os próprios componentes da matriz plasmática na análise do TPM e do PI.

A seletividade dos métodos foi avaliada pela análise de seis fontes distintas de amostras de plasma livre do TPM e PI, sendo quatro amostras normais, uma amostra lipêmica e uma amostra hemolizada. Além disso, amostras de plasma branco foram fortificadas com padrões analíticos de alguns fármacos que podem estar presente em amostras de pacientes, tais como, fenitoína, carbamazepina, lamotrigina, fenobarbital, levitiracetam, gabapentina, oxycarbamazepina, ácido valpróico, clonazepam, clobazam, diazepam, fluoxetina, omeprazol, venlafexina, ácido fólico, captopril e diclofenaco. Os padrões analíticos destes fármacos foram preparados na concentração mais alta da faixa terapêutica plasmática conhecida para cada um deles. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento de extração de acordo com o fluxograma da **Figura 10**.

➤ Efeito residual (*carry over*)

O efeito residual avalia o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente (ANVISA, 2012).

Para o método com detecção DAD, 500 µL de plasma branco foram fortificados com 25 µL de TPM, para obter amostra de concentração plasmática de 30 µg mL⁻¹, correspondente ao Limite Superior de Quantificação (LSQ). Para o método com detecção C⁴D, 200 µL de plasma branco foram fortificados com 25 µL de TPM e 25 µL do PI, para obter amostra de concentração plasmática de 30 µg mL⁻¹ (LSQ) e 15 µg mL⁻¹, respectivamente. Todas as amostras foram processadas de acordo com o fluxograma descrito na **Figura 10**.

Este parâmetro foi avaliado pela injeção de três amostras de plasma branco, também submetidas ao procedimento de extração, sendo uma antes e duas depois da injeção da amostra extraída de concentração correspondente ao LSQ.

➤ Linearidade

A linearidade é a capacidade do método analítico em obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra analisada dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2012; EMA 2011).

A linearidade do método com detecção DAD foi avaliada pela construção de uma curva de calibração analítica ($n = 3$) com amostras de plasma branco (500 μL) fortificadas com 25 μL das soluções de trabalho de TPM nas concentrações de 20, 40, 100, 200, 500 e 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o que corresponde às concentrações plasmáticas de 1, 2, 5, 10, 25 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para o método com detecção C⁴D as amostras de plasma branco (200 μL) foram fortificadas com 25 μL das soluções de trabalho de TPM nas concentrações de 8, 16, 40, 80, 200 e 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o que corresponde às concentrações plasmáticas de 1, 2, 5, 10, 25 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, além de 25 μL da solução de PI, na concentração de 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que corresponde a concentração plasmática de 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito na **Figura 10**.

As curvas analíticas foram avaliadas plotando as concentrações do TPM no eixo das abcissas (*eixo x*) e as áreas obtidas dos picos do TPM para o método com detecção DAD e a razão entre as áreas do TPM e PI para o método com detecção C⁴D, no eixo das ordenadas (*eixo y*).

A linearidade da curva de calibração foi avaliada por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, no qual foi calculado o coeficiente de correlação (r) e a equação da reta ($y = ax + b$), onde “ a ” é o coeficiente angular e “ b ” é o coeficiente linear da reta. A validade estatística dos valores experimentais obtidos para a construção das curvas analíticas foi feita pela análise de variância ANOVA *lack-of-fit*, calculando os valores de F e p , para um nível de confiança de 95% empregando o software Minitab® release versão 14 (*State College, Pennsylvania, EUA*).

➤ Precisão, Exatidão e LIQ

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio e a exatidão é a proximidade obtida

entre o resultado da análise em relação a um valor nominal ou valor verdadeiro (ANVISA, 2011; EMA, 2012).

O LIQ é a menor concentração na qual os analitos podem ser quantificados com precisão e exatidão. (ANVISA, 2011; EMA, 2012).

Precisão e exatidão intra-corridas é a concordância entre os resultados obtidos em análises realizadas no mesmo dia e precisão e exatidão inter-corridas é a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes.

Para avaliar a precisão e exatidão intra-corridas no método com detecção DAD, quintuplicatas de 500 μL de amostras de plasma branco foram fortificadas com 25 μL da solução do TPM nas concentrações plasmáticas de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (LIQ), 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CQB, controle de qualidade de baixa concentração), 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CQM, controle de qualidade de média concentração) e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CQA, controle de qualidade de alta concentração). No método com detecção C⁴D, as amostras do LIQ, CQB, CQM e CQA foram fortificadas com 25 μL da solução do PI. Na precisão e exatidão inter-corridas as amostras foram fortificadas nos mesmos níveis de concentração, em quintuplicata, e as análises realizadas em 3 dias consecutivos. Após a fortificação, todas as amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito na **Figura 10** o coeficiente de variação (CV%) e o erro padrão relativo (EPR%) foram calculados segundo a **Equação 7 e 8**, respectivamente.

$$CV(\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

onde: DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada.

$$EPR(\%) = \frac{\text{Valor obtido} - \text{Valor teórico}}{\text{Valor obtido}} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

➤ Estabilidade

Os testes de estabilidades foram realizados para verificar a estabilidade do TPM em amostras de plasma quando submetidas a condições normalmente exigidas durante a análise.

Na estabilidade de curta duração foi avaliado o tempo em que as amostras podem resistir à temperatura sob a qual normalmente ficam expostas na bancada durante a todo o procedimento analítico. Este ensaio foi avaliado em amostras de plasma branco contendo 500 μL (detecção DAD) e 200 μL (detecção C⁴D) fortificados em dois níveis de concentração plasmática, CQB e CQA, em triplicata, à temperatura ambiente por um período de 8 horas. Após este período, para as amostras do método com detecção C⁴D, 25 μL do PI na concentração plasmática de 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionados. Em seguida as amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito no fluxograma da **Figura 10**.

Na estabilidade de longa duração foi avaliado o tempo médio em que o TPM pode permanecer inalterado quando amostras de plasma são congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este ensaio foi realizado em amostras de plasma branco contendo 500 μL (detecção DAD) e 200 μL (detecção C⁴D) de plasma fortificados em dois níveis de concentração plasmática, CQB e CQA e armazenadas por um período de 37 dias (detecção DAD) e 15 dias (detecção C⁴D Lite) à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após este período, para as amostras do método com detecção C⁴D, 25 μL do PI na concentração plasmática de 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionados e, em seguida, todas as amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito no fluxograma da **Figura 10**. Estes ensaios foram realizados em triplicata.

Na estabilidade de congelamento e descongelamento foi avaliada a capacidade do TPM em resistir à degradação quando submetido a vários ciclos de congelamento e descongelamento. Este ensaio foi avaliado em amostras contendo 500 μL (detecção DAD) e 200 μL (detecção C⁴D) de plasma branco fortificados em dois níveis de concentração plasmática, CQB e CQA e submetidas a em três ciclos de congelamento e descongelamento, com um intervalo de 24 horas. Após este período, 25 μL do PI na concentração plasmática de 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionados nas amostras do método com detecção C⁴D. Em seguida todas as amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito no fluxograma da **Figura 10**. Este ensaio foi realizado em triplicata.

Na estabilidade pós processamento foi avaliado o tempo em que as amostras podem permanecer no auto-injetor depois de preparadas, até serem analisadas. Este ensaio foi realizado em triplicata, em amostras contendo 500 μL (detecção DAD) e 200 μL (detecção C^4D) de plasma branco fortificado em dois níveis de concentração plasmática, CQB e CQA. Para método com detecção C^4D , as amostras foram fortificadas com PI na concentração plasmática de $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ e submetidas ao procedimento de extração descrito na **Figura 10** e somente depois de doze horas foram analisadas. Todas as amostras foram quantificadas com o auxílio de uma curva de calibração analítica no intervalo de concentração plasmática de 1-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Foi também realizada uma avaliação da estabilidade do TPM e PI em solução de metanol. Para isto, as soluções padrão de TPM foram armazenadas em freezer à temperatura de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ e analisadas após 3 meses e a solução padrão de PI foi armazenada por 1 mês, nas mesmas condições. Após este período, as amostras das soluções padrão foram analisadas e comparadas com as soluções padrão do TPM e PI recém preparadas, nas mesmas concentrações e calculado o CV (%) e EPR (%)

3.2.3.2. Validação parcial do método com detector C^4D comercial (EDAQ)

Embora o método com detecção condutométrica tenha sido desenvolvido e validado na Universidade do Texas, Estados Unidos, utilizando plasma humano liofilizado, a aplicação do método em amostras reais foi realizada no Brasil, país no qual residem os pacientes que cederam as amostras para este projeto. O guia de validação para métodos bioanalíticos preconiza que é necessária uma validação parcial em casos de transferência do método para outro laboratório, alterações em equipamentos, faixa de concentração da curva de calibração, volume da amostra limitada, matriz ou espécie, mudança de anticoagulante, procedimento de processamento de amostras, condições de armazenamento, etc. (EMA, 2011). Devido a transferência do método bioanalítico para outro laboratório, bem como a mudança de modelo do detector (de C^4D Lite para C^4D comercial- EDAQ), foi realizada uma validação parcial do método desenvolvido com detector C^4D comercial (EDAQ), avaliando os parâmetros de linearidade, precisão e exatidão intra-corrída, conforme descrito no item 3.2.3.1.

3.3. Aplicação dos métodos desenvolvidos e validados para análise do TPM em amostras de plasma de pacientes em tratamento com TPM, empregando os detectores DAD e C⁴D comercial (EDAQ)

Os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados em amostras de 10 pacientes em tratamento como TPM no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). Todas as amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito no fluxograma da **Figura 10** e a quantificações foram feitas baseada em um curva de calibração analítica no intervalo de concentração plasmática de 1- 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do TPM por CE com detecção DAD e C⁴D Lite

4.1.1. Capilar

A escolha das dimensões do capilar é parâmetro importante na otimização do método, pois estas interferem no tempo de migração, resolução, sensibilidade e dissipação do calor (WEINBERGER, 2000). Sendo assim, para avaliar o TPM pelos métodos com detecção DAD e C⁴D, foi utilizado um capilar de sílica fundida de 75 µm de DI, C_{tot} de 52 cm e C_{ef} de 40 cm.

O condicionamento antes do primeiro uso do capilar deve ser realizado para remover possíveis impurezas da parede do capilar e para ativar os grupos silanóis. Este condicionamento é geralmente realizado com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ seguido de lavagem com água (MAYER, 2001). Além deste primeiro condicionamento, é sugerido e indicado realizar o condicionamento entre corridas para obter uma separação eficiente e repetibilidade entre as análises. Esta etapa faz com que o sistema retorne às condições iniciais de análise, minimizando as variações dos tempos de migração e reduzindo a influência da variação do EOF (de GAITANI; DE OLIVEIRA; BONATO; 2013). Em análises bioanalíticas, quando são usadas amostras biológicas como plasma, soro, sangue e urina, o procedimento de lavagem entre as corridas com solução de NaOH é geralmente realizado para remover possíveis impurezas das amostras biológicas adsorvidas na parede do capilar. O passo de lavagem com NaOH é seguido por lavagem com água e, em seguida, o capilar é equilibrado com o BGE. Entretanto, estes procedimentos de lavagens devem ser cuidadosamente testados, a fim de encontrar as melhores condições (de GAITANI; DE OLIVEIRA; BONATO; 2013).

Para a lavagem entre corridas foi avaliado primeiramente um procedimento com NaOH, água ultrapura e BGE. No entanto, os tempos de migração do TPM apresentaram grandes variações, com valores de CV de 10,3%. Isto pode ser devido ao desarranjo na camada formada pelo CTAB na parede do capilar, provocado pelo contra-íon do BGE, a saber, os íons OH⁻ (FALLER, ENGELHARDT, 1999; SMITH, STRASTERS, KHALEDI, 1991). Assim, foi avaliada uma lavagem somente com BGE

(MANDRIOLI, 2010). Entretanto, mesmo assim ainda foram obtidos altos valores de CV (8,5%). Assim foi avaliada lavagem apenas com metanol, seguido de BGE. Nestas condições, as variações nos tempos de migração do TPM foram bem menores, apresentando CV de 0,3%.

A **Tabela 1** mostra as condições de condicionamento que proporcionaram os melhores resultados em relação às variações no tempo de migração do TPM para as análises com os detectores DAD e C⁴D.

Tabela 1. Condicionamento do capilar para análise do TPM

| Tipo de condicionamento | Lavagens | Tempo | Pressão |
|---|---|------------|---------|
| Condicionamento Inicial: primeiro uso do capilar | Solução NaOH 1 mol L ⁻¹ | 30 minutos | 20 psi |
| | Água ultrapura | 30 minutos | 20 psi |
| Condicionamento no início e no final das atividades do dia | Solução de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ | 10 minutos | 20 psi |
| | Água ultrapura | 10 minutos | 20 psi |
| Condicionamento entre corridas | Metanol | 2 minutos | 20 psi |
| | Solução BGE | 2 minutos | 20 psi |

4.1.2. Avaliação das condições eletroforéticas

➤ Detecção DAD (detecção indireta)

Como o TPM não possui grupos cromóforos, além da solução tampão e do agente modificador de superfície (nesse caso o CTAB), foi necessário adicionar ao BGE um *probe* (coíon cromóforo). O *probe* se fez necessário devido ao tipo de detector (DAD) utilizado neste método. Tendo em vista que o TPM é um ânion, a adição de um modificador de superfície ao BGE faz com que o EOF seja invertido, pois este tensoativo leva à formação de uma dupla camada carregada positivamente no interior do capilar, com consequente alteração no sentido do EOF para o ânodo (que normalmente está em direção ao cátodo (-)). Neste caso houve a necessidade da inversão de polaridade para que ambos, EOF e TPM, migrassem para ânodo, onde está localizado o detector; resultando em análises mais rápidas e redução da dispersão devido à menor difusão longitudinal (KLOCKOW-Beck et al., 1998).

Seleção da solução tampão: para as análises em CE, principalmente com detecção DAD em modo indireto, a avaliação da solução tampão é de suma importância, visto que as adições de quaisquer íons tamponantes que possuam a

mesma mobilidade do *probe* podem levar a um deslocamento competitivo com os íons do analito, levando à perda na sensibilidade analítica. (DOBLE; MACKA; HADDAD, 2000; DOBLE; HADDAD, 1999). Por ser um ácido fraco (pKa 9,7), para que o TPM adquira carga e conseqüentemente, possa migrar em direção ao detector, o BGE utilizado necessita estar em valor de pH uma unidade acima do seu pKa, para que uma porção significativa do TPM esteja na forma ionizada (nesse caso, 90%). Como o *probe* empregado tem um caráter ácido, e para evitar a variação do pH do BGE durante as corridas, o que ocasionaria variação na mobilidade do TPM devido o deslocamento do equilíbrio ácido-base, o uso de uma solução tampão como BGE é indispensável. Dessa maneira, uma solução de BGE composto por TEA foi avaliada. A TEA apresenta características interessantes que a tornam adequadas para a análise em questão: apresenta valor de pKa 10,86, ou seja, terá função de solução tampão e neste valor de pH permitirá que o TPM fique na forma ionizada (VITOR, 2012). Assim a solução de BGE composto por TEA nas concentrações de 10, 15, 20, 25 mmol L⁻¹ foram avaliadas. Os resultados estão sumarizados na **Figura 11**.

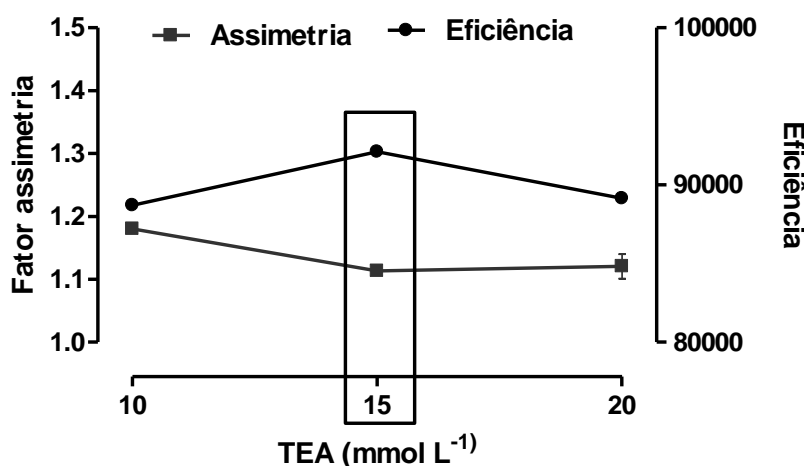


Figura 11. Influência da variação da concentração TEA no fator assimetria e na eficiência do TPM. Condições eletroforéticas: capilar de 75 µm de DI, 40 cm de C_{ef}; BGE composto por CTAB 0,2 mmol L⁻¹, DNB 5 mmol L⁻¹ pH 11,3, tensão aplicada: -20 kV, temperatura de 30°C, injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5 s), comprimento de onda de 254 nm

A concentração de 15 mmol L⁻¹ foi a que proporcionou melhor resultado em relação à eficiência e o fator assimetria do TPM. Portanto esta foi a concentração de TEA selecionada.

Escolha do probe: segundo Klockow-Beck et al., (1998) a escolha do *probe* adicionado ao BGE é baseada na mobilidade eletroforética, que deve ser próxima a do analito, para minimizar a dispersão das bandas e obter picos mais simétricos. O DNB possui mobilidade eletroforética de $29,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e o TPM de $25,1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Portanto, por apresentarem mobilidades eletroforéticas próximas, o DNB foi selecionado como *probe* para a análise do TPM. Além disso, a sua concentração deve ser suficiente alta para manter uma absorção óptica constante, com um baixo ruído da linha de base (KLOCKOW-Beck et al., 1998). Sendo assim, uma amostra de plasma branco foi fortificada com 25 μL de TPM na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e avaliada com BGEs compostos de TEA 15 mmol L^{-1} , CTAB $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e diferentes concentrações de DNB (2, 3, 4 e 5 mmol L^{-1}). A **Figura 12** mostra a relação sinal/ruído da linha de base em função da variação da concentração de DNB, sendo que o valor que apresentou o maior valor de razão sinal/ruído foi a de 5 mmol L^{-1} , escolhida, portanto, para compor o BGE.

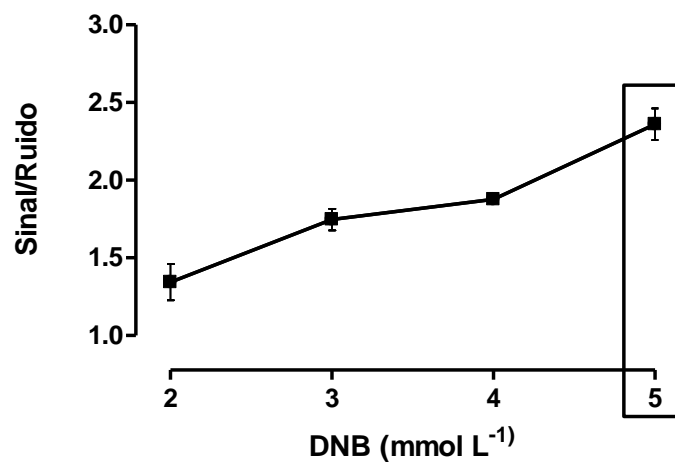


Figura 12. Influência das diferentes concentrações de DNB em relação ao sinal/ruído. Condições eletroforéticas: capilar de 75 μm de DI, 40 cm de C_{ef} ; BGE composto por TEA 15 mmol L^{-1} , CTAB $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 11,3, tensão aplicada: -20 kV, temperatura de 30°C , injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5s), comprimento de onda de 254nm

Seleção do modificador da superfície do capilar: a adição de um tensoativo catiônico ao BGE faz com que o EOF seja invertido, pois este tensoativo leva à formação de uma dupla camada carregada positivamente no interior do capilar, com consequente alteração no sentido do EOF para o ânodo, resultando em análises mais rápidas e redução da dispersão devido à menor difusão longitudinal

(KLOCKOW-Beck et al.,1998). Neste caso houve a necessidade da inversão da polaridade (negativo na injeção) para que ambos, EOF e TPM, migrassem para o ânodo (positivo), em direção ao detector. Como modificador foi utilizado o CTAB, e a influência da sua concentração (0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mmol L⁻¹) no tempo de migração e no fator assimetria do pico do TPM são apresentados na **Figura 13**.

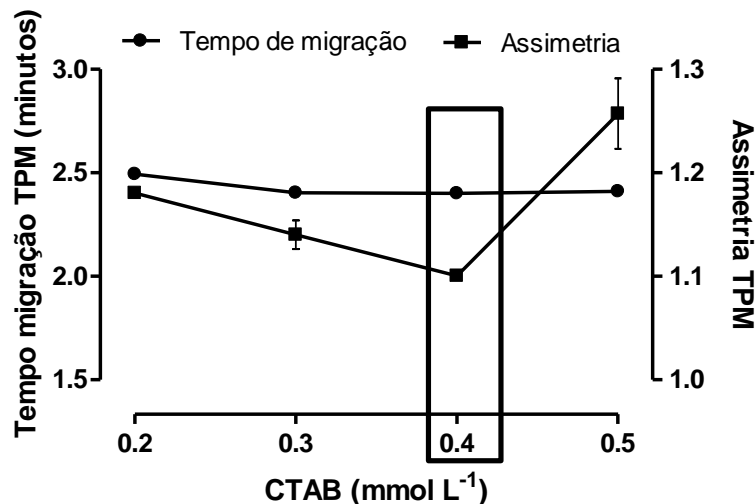


Figura 13. Influência da variação da concentração do CTAB no tempo de migração do TPM e no fator assimetria do TPM. Condições eletroforéticas: capilar de 75 µm de DI, 40 cm de C_{ef}; BGE composto por TEA 15 mmol L⁻¹, DNB 5 mmol L⁻¹, pH 11,3, tensão de -20 kV, temperatura de 30°C, injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5s), comprimento de onda de 254 nm

Pode ser observado que variações nas concentrações do CTAB não resultaram em diferença significativa no tempo de migração do TPM (CV de 0,2%). Já em relação ao fator de assimetria, a concentração que resultou em pico mais simétrico foi a de 0,4 mmol L⁻¹. Sendo assim, esta foi a concentração selecionada.

A importância do uso do CTAB para o desenvolvimento deste método foi observado principalmente nas menores concentrações do TPM (1 e 2 µg mL⁻¹). Sem o uso do CTAB estes pontos da curva de calibração analítica ficavam mal definidos (**Figuras 14 e 15**). Já com o uso do CTAB, os picos ficaram bem definidos, provavelmente devido à mudança conformacional da parede do capilar e a redução da dispersão longitudinal, evitando que substâncias presentes no plasma interferissem na migração dos íons, e/ou interagissem com a própria superfície do capilar alterando o EOF (KLOCKOW-Beck et al., 1998).

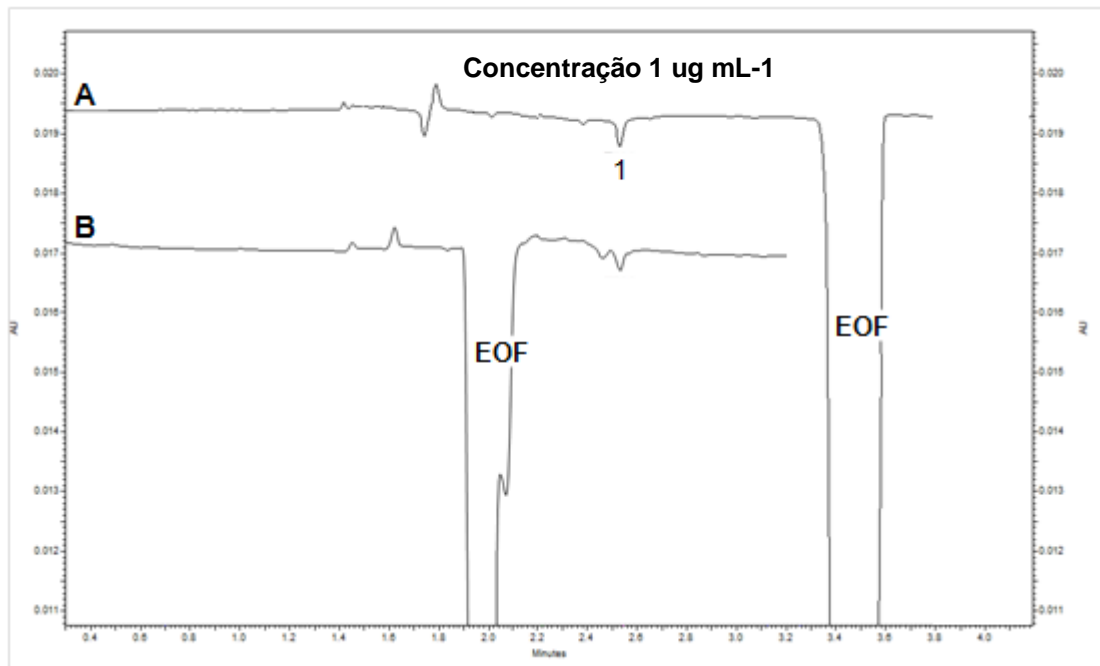


Figura 14. Eletroferogramas referentes às análises das amostras de plasma fortificadas com TPM (1) na concentração plasmática de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ com a adição do CTAB no BGE (A) e sem adição do CTAB (B). Condições eletroforéticas: capilar de $75\ \mu\text{m}$ de DI, 40 cm de C_{ef} ; BGE composto por DNB $0,4\ \text{mmol L}^{-1}$, TEA $15\ \text{mmol L}^{-1}$ pH 11,3, tensão de $-20\ \text{kV}$, temperatura de 30°C , injeção hidrodinâmica ($0,8\ \text{psi}$ por 5s), comprimento de onda de $254\ \text{nm}$

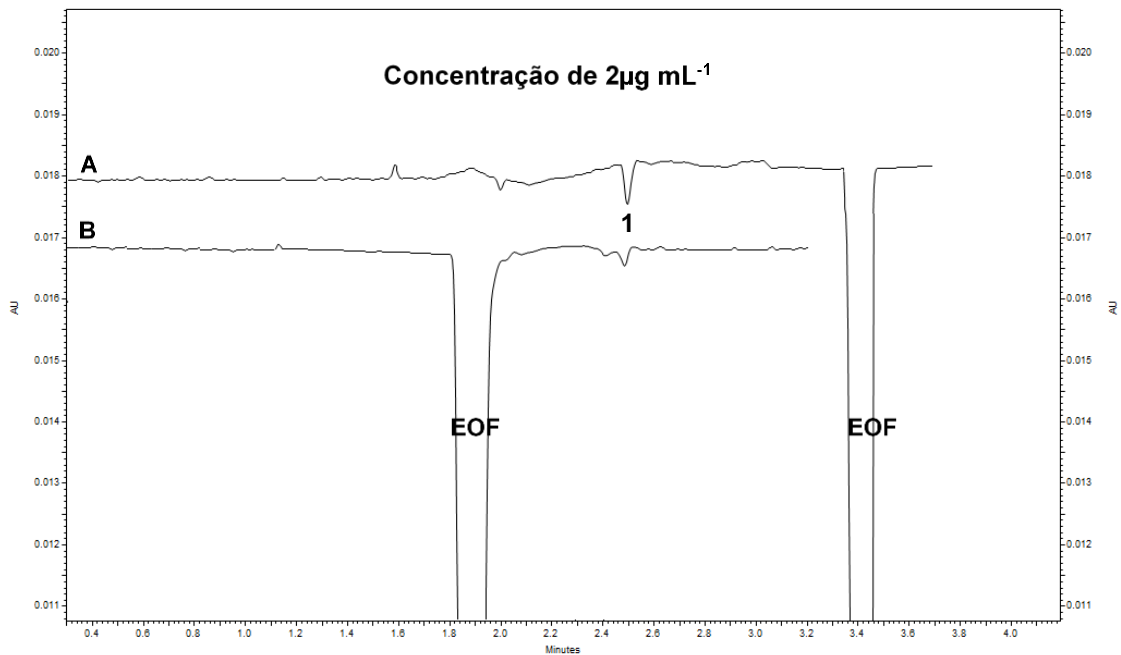


Figura 15. Eletroferogramas referentes às análises das amostras de plasma fortificadas com TPM (1) na concentração plasmática de $2\mu\text{g mL}^{-1}$ com a adição do CTAB no BGE (A) e sem adição do CTAB (B). Condições eletroforéticas: capilar de $75\ \mu\text{m}$ de DI, 40 cm de C_{ef} ; BGE composto por DNB $0,4\ \text{mmol L}^{-1}$, TEA $15\ \text{mmol L}^{-1}$ pH 11,3, tensão de $-20\ \text{kV}$, temperatura de 30°C , injeção hidrodinâmica ($0,8\ \text{psi}$ por 5s), comprimento de onda de $254\ \text{nm}$.

Avaliação da tensão aplicada: a diferença de potencial aplicada entre as extremidades do capilar, resultando num campo elétrico longitudinal, é considerada a força motriz por trás da migração de íons em CE, uma vez que ambas as velocidades de migração, eletroforética e do EOF, são diretamente proporcionais ao campo elétrico e altos valores de campo elétrico resultam em menores tempos de migração (WEINBERGER, 2000; WREN, 2001). A tensão aplicada foi avaliada construindo uma curva baseada na lei de *Ohm*, na qual a tensão aplicada é diretamente proporcional a corrente gerada. Para a construção da curva de *Ohm* foram aplicadas diferentes valores de tensão (5, 10, 15, 20, 25 e 30 kV) e os valores de corrente eletroforética foram registrados para cada valor de tensão aplicada. Observando a curva de *Ohm* na **Figura 16**, a partir da tensão de 20 kV nota-se um desvio de linearidade entre a tensão aplicada e a corrente gerada, sendo 20 kV escolhido como potencial para separação.

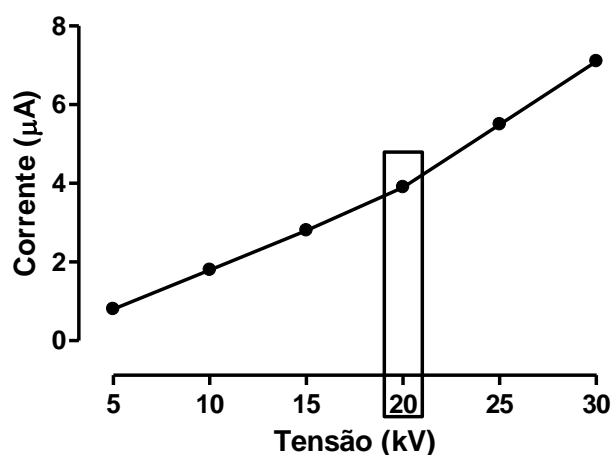


Figura 16. Influência da tensão sobre a corrente. Condições eletroforéticas: capilar de 75 µm de DI, 40 cm de Cef; BGE composto por TEA 15 mmol L⁻¹, DNB 5 mmol L⁻¹, CTAB 0,4 mmol L⁻¹ pH 11,3, temperatura de 30°C, injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5 s), comprimento de onda de 254 nm

Avaliação da temperatura: a temperatura tem um importante papel em muitas separações devido à sua relação com a mobilidade do soluto e do EOF. A mobilidade eletroforética e o EOF aumentam com a temperatura por causa da diminuição da viscosidade, causando uma redução nos tempos de migração (WEINBERGER, 2000).

Na **Figura 17** pode ser observado que o aumento da temperatura ocasionou redução no tempo de migração do TPM, porém também ocasionou redução na eficiência do pico correspondente ao TPM, isto pode ter ocorrido devido ao efeito

joule, ou seja, ineficiência do capilar em dissipar o calor gerado (WEINBERGER, 2000)

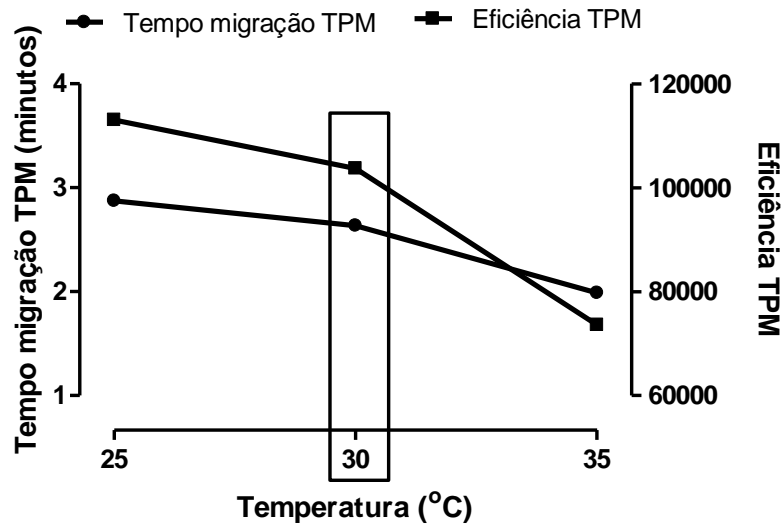


Figura 17. Influência da variação da temperatura no tempo de migração e na eficiência do TPM. Condições eletroforéticas: capilar de 75 μm de DI, 52 C_{tot} e 40 cm de C_{ef} ; BGE composto por CTAB 0,4 mmol L^{-1} , TEA 15 mmol L^{-1} , DNB 5 mmol L^{-1} pH 11,3 tensão de -20 kV, injeção hidrodinâmica (0,8 psi, 5s), comprimento de onda de 254nm.

Apesar da temperatura de 25°C ter apresentado maior eficiência, a temperatura de 30°C foi selecionada para garantir a não floculação do CTAB no BGE, visto que o valor do ponto *Kraft* de temperatura (limite de solubilidade de monômeros e micelas) do CTAB é de 25 °C (FURUSAWA et al., 2000).

Depleção do BGE: O BGE sofre mudanças durante as análises devido à intensa aplicação de tensão, ocasionando perda de repetibilidade. Este fenômeno é conhecido como depleção do BGE e é responsável pela diminuição da precisão das análises (de GAITANI; DE OLIVEIRA; BONATO; 2013). Em soluções aquosas, a eletrólise da água produz prótons (H^+) no ânodo e íons hidróxidos (OH^-) no cátodo. Conseqüentemente, o reservatório do ânodo ficará cada vez mais ácido e o reservatório do cátodo cada vez mais alcalino. O resultado desta depleção é um gradiente de pH no interior do capilar, quando a tensão é aplicada, que levará a um grande impacto na ionização das espécies e na magnitude do EOF, afetando a área do pico, tempo de migração, resolução e eficiência (de GAITANI; DE OLIVEIRA; BONATO; 2013).

O teste de eletrólise ou depleção do tampão normalmente é realizado por injeções consecutivas do analito usando a mesma solução de BGE e observando se há variações significativas no tempo de migração. Para avaliar a eletrólise das soluções do BGE (DNB 5 mmol L⁻¹, CTAB 0,4 mmol L⁻¹ e TEA 15 mmol L⁻¹) foram realizadas 15 análises consecutivas e foi observado que até 10 injeções não houve diferenças significativas no tempo de migração (CV de 0,4 %).

➤ **Detector C⁴D Lite**

O princípio de detecção do C⁴D é baseado na diferença de condutividade entre analito e o seu coíon presente no BGE, sendo neste caso, medida através da diferença de condutividade na célula de detecção (SAITO, 2011; BRITO-NETO et al., 2005). Dessa forma, analitos com mobilidade superior ao do coíon, ao passar pela célula de detecção, aumentam a condutância local e como consequência, picos positivos são obtidos. Por outro lado, para analitos com menor mobilidade, picos negativos (vales na linha de base) são obtidos (SAITO, 2011). Portanto, quanto maior a diferença entre a mobilidade do analito e do seu coíon presente no BGE, maior o ganho em sensibilidade (BRITO-NETO et al., 2005).

Como já mencionado anteriormente, o TPM possui baixa mobilidade ($25,1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Assim, o uso de um coíon de alta mobilidade é a melhor opção para aumentar a sensibilidade do método proposto. Baseado no trabalho de Vitor (2012) que determinou ânions de baixa mobilidade utilizando TEA, para este método optou-se em avaliar também a TEA como BGE, da mesma forma que foi proposto no método de quantificação do TPM com detecção DAD. Assim, foram avaliadas a influência de diferentes concentrações de TEA (10, 15 e 20) mmol L⁻¹ no fator de assimetria e eficiência do pico do TPM (**Figura 18**). Como pode ser observado, a maior eficiência e menor fator de assimetria foram obtidos utilizando TEA na concentração de 15 mmol L⁻¹, sendo essa a concentração selecionada.

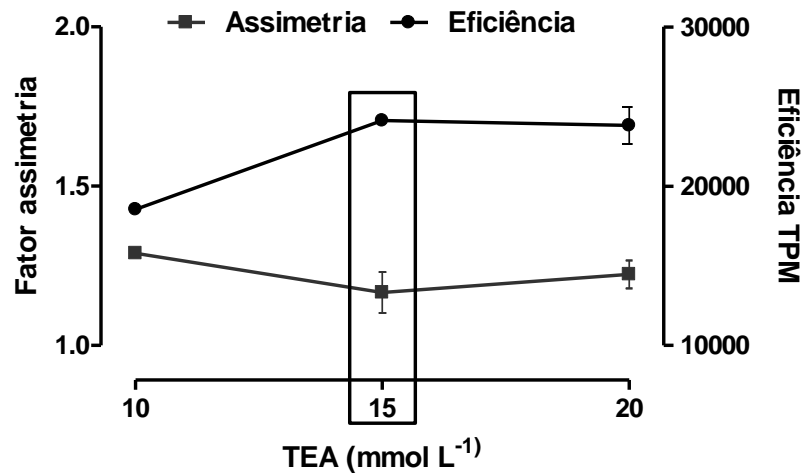


Figura 18. Influência da concentração de TEA no fator de assimetria e na eficiência do pico do TPM. Condições eletroforéticas: capilar de 75 μm de DI, 52 C_{tot} e 40 cm de C_{ef} ; BGE composto por CTAB 0,4 mmol L⁻¹, TEA 15 mmol L⁻¹, DNB 5 mmol L⁻¹ pH 11,3 tensão de -20 kV, injeção hidrodinâmica (0,8 psi, 5s)

Avaliação da tensão: A escolha da tensão a ser aplicada foi avaliada construindo uma curva de corrente em função do potencial aplicado, onde, de acordo com a lei de *Ohm*, a corrente gerada é diretamente proporcional ao potencial. Para construção da curva de *Ohm*, o capilar foi preenchido com o BGE composto por TEA 15 mmol L⁻¹ e para cada valor de tensão aplicado (5, 10, 15, 20, 25 e 30 kV), foi registrada a corrente gerada. Pode ser observado, na **Figura 19**, que a partir da tensão de 20 kV houve desproporcionalidade entre a tensão aplicada e a corrente gerada. Portanto a tensão de 20 kV foi escolhida, assim como no eletrólito anterior.

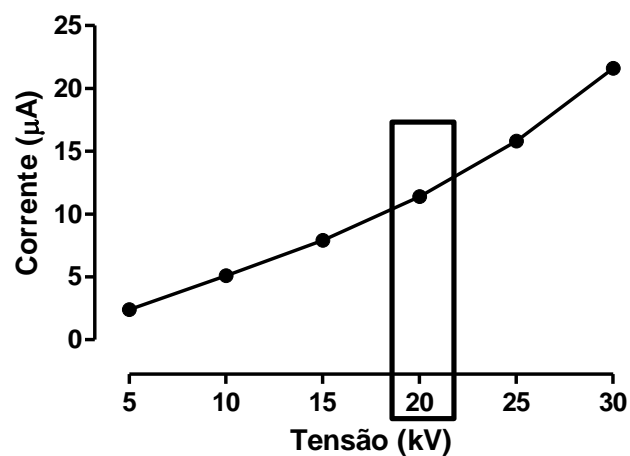


Figura 19. Influência da tensão sobre a corrente elétrica. Condições eletroforéticas: capilar de 75 μm de diâmetro interno, 40 cm de C_{ef} ; BGE composto por TEA 15 mmol L⁻¹ pH 11,3, temperatura de 30 °C, injeção hidrodinâmica (0,8 psi por 5 s)

Avaliação da temperatura: o detector C⁴D foi adaptado a uma peça (cassete) do equipamento de CE. Esta adaptação do detector no cassete não permitiu que fosse utilizado o sistema de refrigeração próprio do equipamento de CE, a base do líquido refrigerador *coolant*. Neste caso optou-se em trabalhar à temperatura ambiente (25 °C) controlada pelo condicionador de ar do laboratório. Para avaliar a reprodutibilidade do método, foram realizadas oito injeções consecutivas da mesma amostra de TPM. Após a injeção, não foram observadas variações significativas nos tempos de migração do TPM (CV de 0,3%) para todas as concentrações avaliadas.

Depleção do BGE: para avaliar a eletrólise do BGE (composto por TEA 15 mmol L⁻¹), 15 amostras de TPM foram analisadas consecutivamente. Os resultados obtidos demonstraram que até a décima injeção, o CV (%) obtido para o tempo de migração do TPM foi de 0,4%, sendo aceito valores de variação de até 1 % (MAYER, 2001). Portanto para este método a solução dos reservatórios do *inlet* e *outlet* foi trocada a cada 10 análises.

Após avaliação de todos os parâmetros eletroforéticos, as condições que apresentaram os melhores resultados para análise do TPM utilizando os detectores DAD e C⁴D estão sumarizados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Condições estabelecidas para análise do TPM.

| Parâmetro | Detecção DAD | Detecção C ⁴ D |
|-----------------------|--|--|
| Capilar | 75 µm DI, 52 cm C _{tot} e 40 cm C _{ef} | 75 µm DI, 52 cm C _{tot} e 40 cm C _{ef} |
| Injeção hidrodinâmica | 0,8 psi por 5 segundos | 0,8 psi por 5 segundos |
| BGE | TEA 15 mmol L ⁻¹ DNB 5 mmol L ⁻¹ CTAB 0,4 mmol L ⁻¹ | TEA 15 mmol L ⁻¹ |
| pH do BGE | 11,3 | 11,3 |
| Tensão | -20 kV | 20 kV |
| Temperatura | 30°C | 25°C |

4.2. Desenvolvimento e validação do método para análise do TPM em plasma por detecção indireta (DAD) e condutométrica (C⁴D Lite)

4.2.1. Preparo das amostras

O pré-tratamento das amostras biológicas, que abrange as etapas de extração, pré-concentração e purificação, tem sido requerido nas análises cromatográficas de fármacos, para eliminar interferentes (compostos endógenos ou outros fármacos administrados concomitantemente com os analitos) e aumentar a sensibilidade analítica (QUEIROZ, LANÇAS, 2005). Um método de extração ideal deve ser rápido, simples, de custos reduzidos, e promover recuperações altas e reprodutíveis sem a degradação dos analitos. Além disso, não deve gerar grandes quantidades de resíduos químicos (van HOUT et al., 2003).

A LLE é a principal técnica de extração utilizada para análises de fármacos em matrizes biológicas e baseia-se na solubilidade do analito em duas fases imiscíveis: a aquosa (plasma) e orgânica (solvente orgânico). Neste trabalho foi utilizada a técnica de LLE como procedimento de preparo de amostras devido às vantagens de simplicidade, reprodutibilidade, baixo custo relativo e a disponibilidade comercial de vários tipos de solventes puros, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade (BONATO, JABOR, OLIVEIRA, 2010; QUEIROZ, COLLINS, JARDIM, 2001). Entretanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens como o uso de altas quantidades de solventes, dificuldade de automação, baixa extração de compostos hidrofílicos, além do problema da ocorrência de emulsão (BONATO, JABOR, OLIVEIRA, 2001). O solvente orgânico ideal deve ser volátil, para permitir a concentração do soluto e minimizar o tempo de preparo das amostras, seletivo para o analito, e ser menos denso do que a fase aquosa, para facilitar a remoção do solvente orgânico do sistema de partição (WELLS, 2003).

Para avaliação do solvente extrator do método com detecção DAD, foi necessário manter o pH do plasma abaixo do pKa do TPM (ao menos uma unidade de pH), garantindo que o TPM fique na forma não ionizada, favorecendo a sua partição para a fase orgânica. Portanto, foi utilizada uma solução tampão TRIS, pH 8,3. Foram avaliados como solvente extrator: acetato de etila, éter de petróleo e MTBE. Para isto, 500 µL de plasma branco foram fortificados com TPM. A seguir, foi

adicionado 150 μ L da solução tampão TRIS e 2mL de cada solvente a ser avaliado. Os tubos foram vedados cuidadosamente devido à volatilidade dos solventes descritos e, posteriormente, agitados em *vortex* por 30 segundos. Após centrifugação (1.800 g, 5 minutos), 1,5 mL do solvente orgânico foi recolhido em tubos cônicos e evaporado sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram redissolvidos em 100 μ L de água ultrapura e realizada a análise eletroforética. As análises foram realizadas em triplicata para cada solvente avaliado. A **Figura 20** mostra o gráfico comparativo entre as recuperações obtidas para cada solvente.

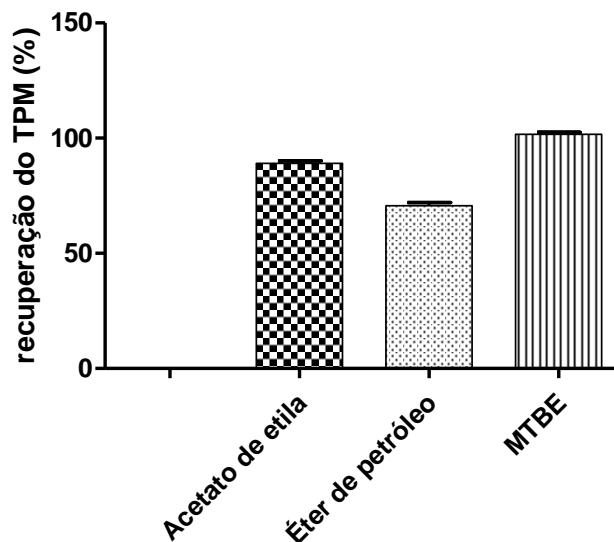


Figura 20. Efeito do solvente orgânico na extração do TPM para o método com detecção indireta (DAD)

Como pode ser observado na **Figura 21**, o solvente que proporcionou maior recuperação foi o MTBE. Sendo assim, este foi selecionado como solvente extrator para o desenvolvimento de ambos os métodos, com detecção DAD e C⁴D Lite.

Para o desenvolvimento de métodos bioanalíticos, é recomendado, quando possível, o uso de PI para minimizar o efeito devido às perdas que podem ocorrer no processo de extração do fármaco da matriz biológica. Alguns analitos com características físico-químicas semelhantes à do TPM foram selecionados. Geralmente, os mais utilizados são fármacos da mesma classe terapêutica. No entanto, é necessário ter cautela, pois fármacos da mesma classe terapêutica são, às vezes, utilizados em politerapia com o TPM, a fim de tentar controlar as crises epilêpticas (GUERREIRO, 2006). Assim, estes fármacos podem estar presentes na

amostra do paciente e por isso eles não devem ser utilizados como PI. Além disso, como o TPM não possui grupos cromóforos, é ideal que o PI também atenda a esta característica.

Assim, para o método com detecção DAD, foram avaliados os seguintes analitos: terbutalina, aspartato, glicina, glutamato, alendronato de sódio, ϵ -ácido n-amino capróico, ácido capróico, ácido butírico, acetamida e propionamida. De todos estes compostos analisados, apenas o ácido capróico e o ϵ -ácido n-amino capróico foram detectados e completamente resolvidos do TPM. Apesar disso, o ácido capróico comigrou com o pico de sistema presente no eletroferograma, dificultando sua quantificação e tornando inviável seu uso com PI. Sendo assim, este não pode ser usado como PI. Quanto ao ϵ ácido n-amino capróico, um aumento nos tempos de migração foi observado com o aumento da concentração do TPM, inviabilizando também seu uso como PI. Isto ocorreu, provavelmente, devido a uma titulação do ϵ -ácido n-amino capróico com o TPM. Portanto, nenhum dos compostos avaliados foram adequados para ser usado como PI. De acordo com Karbes e colaboradores (1991) e Ribani e colaboradores (2004), o uso do PI em um método de quantificação não tem regras ou guias, desde que o resultado final do método proporcione boa precisão e exatidão. Segundo as condições apresentadas na **Tabela 3** o método demonstrou boa precisão e exatidão, podendo ser utilizado de forma confiável para a determinação de TPM em amostras de plasma de pacientes, sem necessidade do PI.

Para o método com detecção C⁴D, dois compostos foram avaliados como PI: fenol e 2-naftol β . Apesar dos picos do fenol e TPM apresentarem boa resolução, foi observada variação significativa na área do pico correspondente ao fenol, o que pode ser atribuído a perdas devido à alta volatilidade desse composto. Já o 2-naftol β , além de apresentar boa resolução em relação ao pico do TPM, a área do pico manteve-se constante ao longo dos experimentos, sendo então, definido como PI para a validação do método empregando o detector C⁴D.

4.2.2. Avaliação dos métodos

4.2.2.1. Validação dos métodos utilizando detector DAD e C⁴D Lite

➤ Seletividade

Em geral, uma forma simples de avaliar este parâmetro é verificar se alguma espécie presente na matriz possui tempo de migração semelhante ao analito de interesse ou se algum sinal (pico) é observado próximo ao pico do analito ou PI. Assim, seis fontes diferentes de amostras de plasmas, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada, e outras amostras de plasma branco fortificadas com possíveis fármacos que podem ser coadministrados aos pacientes durante ao tratamento da epilepsia, foram submetidas ao procedimento de extração descrito na **Figura 10** e os tempos de migração obtidos comparados com o tempo de migração do TPM ou PI, nas mesmas condições analíticas. Como pode ser observado nas **Figuras 21 e 22**, não foram observadas a presença de nenhum pico interferente no tempo de migração do TPM ou do 2-naftol β .

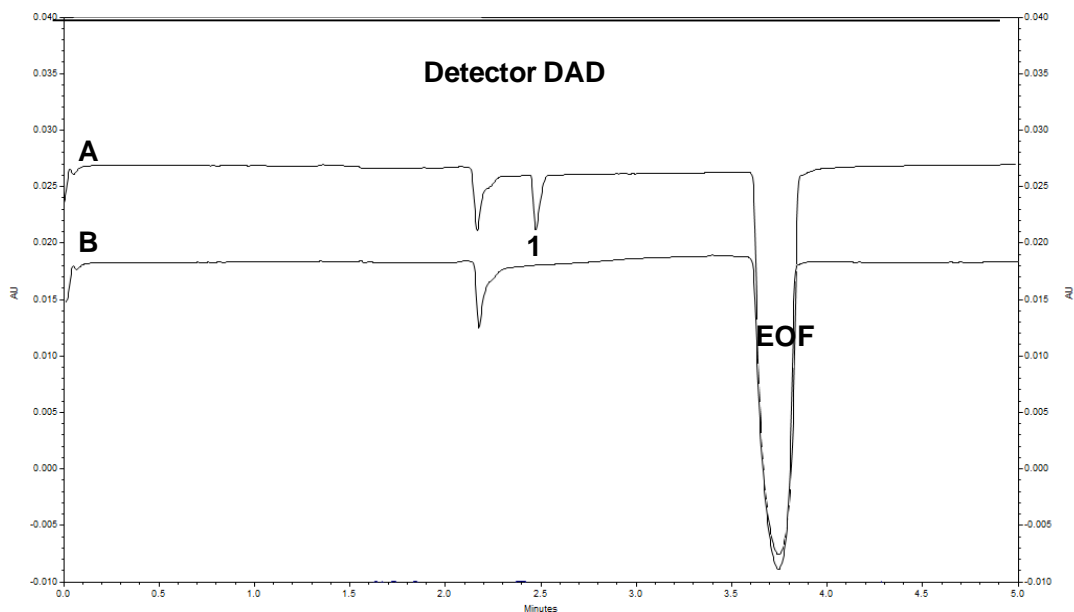


Figura 21. Eletroferograma representativo da seletividade do método. Amostra fortificada com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TPM (A); amostra de plasma branco (B). TPM (1). Condições eletroforéticas: capilar de $75 \mu\text{m}$ de DI, $52 C_{\text{tot}}$ e 40 cm de C_{ef} ; BGE composto por DNB $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$, CTAB $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$, TEA 15 mmol L^{-1} pH 11,3, tensão de -20 kV , temperatura de 30°C , injeção hidrodinâmica ($0,8 \text{ psi}$ por 5 s), comprimento de onda de 254 nm

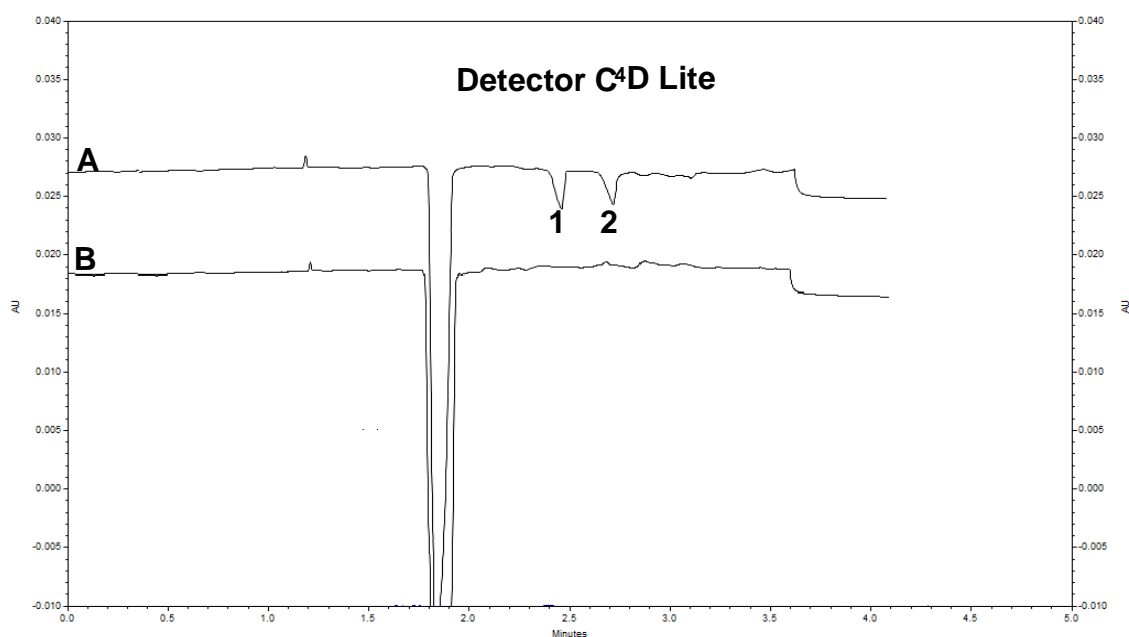


Figura 22. Eletroferograma representativo da seletividade do método. Amostra fortificada com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TPM (A); amostra de plasma branco (B). TPM (1), 2-naftol β (2). Condições eletroforéticas: capilar de $75 \mu\text{m}$ de DI, $52 C_{\text{tot}}$ e 40 cm de C_{ef} ; BGE: TEA 15 mmol L^{-1} pH 11,3, tensão de 20 kV , temperatura de 30°C , injeção hidrodinâmica ($0,8 \text{ psi}$ por 5 s)

➤ Efeito residual (*carry over*)

O efeito residual foi avaliado após a injeção de 3 amostras de plasma brancos submetidas ao procedimento de extração LLE, sendo uma antes e duas após a injeção de uma amostra de plasma branco fortificada com TPM na concentração referente ao LSQ. Para os dois métodos avaliados, utilizando detecção indireta e condutométrica, não foram observados efeitos residuais.

➤ Linearidade

A curva de calibração referente à linearidade foi feita em triplicata em 6 níveis de concentração plasmática ($1, 2, 5, 10, 25$ e $30 \mu\text{g mL}^{-1}$) do TPM e foi construída avaliando a área dos picos obtidos do TPM para o método com detecção DAD e a razão entre a área do pico do TPM e PI para o método com detecção C^4D em função da sua respectivas concentrações. A **Tabela 3** apresenta as equações e respectivos coeficientes de correlação linear (r) das curvas analíticas para o TPM usando detecção indireta e condutométrica. Os valores dos coeficientes de correlação foram

superiores a 0,99. A validade estatística dos valores experimentais obtidos para as curvas analíticas foi avaliada pela análise de variância (ANOVA – *lack-of-fit*), cujo resultado também é mostrado na **Tabela 3**. Estes resultados mostram linearidade adequada, pois os valores de p foram maiores que 0,05 e os valores de F calculados foram menores do que o tabelado (3,25).

Tabela 3. Linearidades dos métodos para análise do TPM

| Detector | Intervalo ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Equação Linear | r | ANOVA <i>lack-of-fit</i> ^c | |
|-----------------------|--|------------------------|-------|--|---------|
| | | | | F-valor | p-valor |
| DAD | 1,00 - 30,00 | $y = 683,17x - 223,73$ | 0,996 | 2,14 | 0,13 |
| C ⁴ D Lite | 1,00 - 30,00 | $y = 0,0368x - 0,016$ | 0,997 | 1,25 | 0,12 |

Curva de calibração foi preparada em triplicata para as concentrações 1, 2, 5, 10, 25 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do TPM, $y = ax + b$, em que y é a resposta do equipamento (área do pico do analito (detecção indireta) e razão entre área do pico do analito e PI (detecção condutométrica), a é o coeficiente angular, b é o coeficiente linear; ^c $F_{\text{tabelado}}(0,05) = 3,25$

➤ Precisão, Exatidão e LIQ

A precisão e exatidão dos métodos com detecção indireta e condutométrica foram avaliadas em quatro níveis de concentração (LIQ, CQB, CQM, CQA), em quintuplicata e em três dias consecutivos, respectivamente. A **Tabela 4** apresenta os valores de precisão e exatidão intra e inter-corridas para o TPM. Todos os valores de CV e EPR estão de acordo com os valores preconizados pelos guias da Anvisa e EMEA (abaixo de 20% para o LIQ e abaixo de 15% para o CQB, CQM e CQA).

Tabela 4. Precisão, exatidão e LIQ do método para análise TPM com detecção indireta e condutométrica

| Detector | | Intra-corridas (n = 5) | | | | Inter-corridas (n = 5) | | |
|-----------------------|-----|--|---|--------|---------|---|--------|---------|
| | | Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Concentração Obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | CV (%) | EPR (%) | Concentração Obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | CV (%) | EPR (%) |
| DAD | LIQ | 1,00 | 1,10 | 7,5 | 10,3 | 1,04 | 5,2 | 12,2 |
| | CQB | 2,00 | 2,16 | 5,3 | 8,1 | 2,03 | 5,5 | 5,7 |
| | CQM | 10,00 | 9,92 | 6,6 | -0,8 | 10,03 | 4,3 | 3,1 |
| | CQA | 25,00 | 24,98 | 4,5 | -0,1 | 25,15 | 3,5 | 3,7 |
| C ⁴ D Lite | LIQ | 1,00 | 1,04 | 6,6 | 4,0 | 1,10 | 11,1 | 10,0 |
| | CQB | 2,00 | 1,78 | 12,6 | -10,8 | 1,98 | 9,7 | -1,3 |
| | CQM | 10,00 | 11,39 | 3,7 | 13,9 | 11,13 | 4,8 | 10,7 |
| | CQA | 25,00 | 25,69 | 4,6 | 2,7 | 26,03 | 6,2 | 3,6 |

Em relação ao LIQ, alguns métodos citados no **Quadro 1** apresentam valores menores do que o obtido no presente trabalho. Entretanto, apesar da detectabilidade obtida no método descrito por Bahrami et al (2005) (40 ng mL^{-1}), este utilizou procedimento de derivatização com cloroformiato de 9-fluorenilmetil para a detecção do TPM, que possui a desvantagem de incluir mais uma etapa no procedimento e, portanto tornar a análise mais longa. Já os métodos descritos por Park e colaboradores (2008), Kumar (2013) e Subranmanian e colaboradores (2008) apresentaram os menores limites de quantificação (20 ng mL^{-1} , $20,61 \text{ ng mL}^{-1}$ e $0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), entretanto estes autores utilizaram detecção por espectrometria de massas, que são detectores de alto custo para aquisição e manutenção.

➤ Estabilidade

A estabilidade do TPM foi avaliada após processamento (12 horas), em três ciclos de congelamento e descongelamento, curta duração (12 h) e longa duração: 37 dias para o método com detecção indireta e 20 dias para o método com detecção condutométrica. O TPM apresentou estabilidade em todos os ensaios realizados, com valores de precisão (CV %) e exatidão (EPR %) abaixo de 15% (**Tabela 5**).

Tabela 5. Estabilidade do TPM para o método com detecção indireta e condutométrica

| Estabilidade | Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | DAD | | | C ⁴ D Lite | | |
|-----------------------------------|---|--|-----------|------------|--|-----------|------------|
| | | Concentração Obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | CV (%) | EPR (%) | Concentração Obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | CV (%) | EPR (%) |
| | | | | | | | |
| Pós processamento | 2,00 | 2,22 | 1,3 | 10,9 | 2,1 | 3,5 | 8,8 |
| | 25,00 | 26,17 | 4,4 | 4,7 | 25,9 | 0,5 | 3,8 |
| Congelamento / descongelamento | 2,00 | 1,97 | 0,3 | -1,7 | 1,8 | 12,0 | -4,2 |
| | 25,00 | 23,62 | 3,9 | -5,5 | 24,7 | 1,0 | -0,9 |
| Curta duração | 2,00 | 1,85 | 4,5 | -7,7 | 2,1 | 5,4 | 6,8 |
| | 25,00 | 25,22 | 3,1 | 0,8 | 23,8 | 5,3 | -6,0 |
| Longa duração (-20°C) | 2,00 | 2,06 | 5,2 | 2,9 | 2,0 | 5,2 | 2,9 |
| | 25,00 | 25,92 | 2,7 | 3,6 | 25,9 | 2,7 | 3,6 |

A estabilidade das soluções estoque de PI e TPM em metanol foi avaliada em triplicata e apresentaram estabilidade por até 1 e 3 meses, respectivamente, quando estocada à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ com valores de EPR abaixo de 10%.

4.2.2.2. Validação parcial do método com detecção condutométrica C⁴D comercial

Foi necessária a validação parcial do método condutométrico devido à mudança de laboratório e modelo do detector. Assim, foi realizado o parâmetro linearidade, no mesmo intervalo de concentração descrito para os outros detectores DAD e C⁴D Lite, bem como o mesmo procedimento de preparo de amostra. Para a avaliação da linearidade foi aplicado o modelo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A **Tabela 6** apresenta os resultados da linearidade e da análise de variância ANOVA - *lack-of-fit*

Tabela 6. Linearidade do método para detecção condutométrica comercial.

| Detector | Intervalo ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Equação Linear ^a | r ^b | ANOVA | |
|---------------------------------|--|-----------------------------|------------------|--------------------------|---------|
| | | | | lack-of-fit ^c | |
| | | | | F-valor | p-valor |
| C⁴D comercial | 1,00 - 30,00 | $y = 0,1022x - 0,0002$ | 0,998 | 1,39 | 0,29 |

^a Curva de calibração foi preparada em triplicata para as concentrações 1, 2, 5, 10, 25 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do TPM, $y = ax + b$, em que y é a resposta do equipamento (razão das áreas entre TPM e PI), a é o coeficiente angular, b é o coeficiente linear, e x é a concentração da solução medida em $\mu\text{g mL}^{-1}$. ^b Coeficiente de correlação linear. ^c $F_{\text{tabelado}}(0,05) = 3,25$

Além da linearidade do método, também foram avaliados os parâmetros precisão e exatidão intra-corridas, como preconizado pelo EMA, em quintuplicata nas concentrações do LIQ, CQB, CQM e CQA. A **Tabela 7** apresenta os valores de precisão e exatidão intra-corridas para o TPM, todos abaixo de 15% e 20%, para o CQB, CQM e CQA e LIQ, respectivamente (Anvisa 2012; EMA 2011).

Tabela 7. Precisão e exatidão da validação parcial do método de quantificação do TPM em plasma, com detecção condutométrica comercial.

| Detector | CQs | Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Intra-corridas (n = 5) | | |
|-----------------------------------|-----|--|---|-----------|------------|
| | | | Concentração Obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | CV (%) | EPR (%) |
| C⁴D (comercial) | LIQ | 1,00 | 0,87 | 6,7 | -13,0 |
| | CQB | 2,00 | 1,80 | 4,8 | -12,0 |
| | CQM | 10,00 | 10,74 | 6,3 | 7,4 |
| | CQA | 25,00 | 24,71 | 2,2 | -1,1 |

CQB (controle de qualidade baixo; CQM (controle de qualidade médio); CQA (controle de qualidade alto); LIQ (limite inferior de quantificação)

4.3. Aplicação dos métodos validados para a análise de amostras de plasma de pacientes em tratamento com TPM, empregando os detectores DAD e C⁴D comercial

O topiramato é um fármaco com ação epiléptica, amplamente utilizado no tratamento de epilepsia em pacientes refratários ao tratamento convencional. Uma característica importante do TPM é que a concentração plasmática apresenta grande variabilidade interindividual, muitas vezes não correspondendo às doses

administradas. Assim, alguns pacientes apresentam resposta clínica máxima em baixas doses e outros necessitam de doses muito altas para obter o mesmo efeito (MARQUES, 2015). Assim os métodos desenvolvidos e validados neste projeto podem ser aplicados para a quantificação do TPM em amostras dos pacientes que fazem uso deste fármaco, possibilitando o ajuste de dose, caso necessário. Isso traz vantagens ao tratamento, pois permite ajuste de dose tanto no sentido de atingir a concentração terapêutica como no sentido de diminuir as reações adversas. Além disso, permite verificar a adesão do paciente ao tratamento. Para demonstrar a aplicação dos métodos, amostras de plasma de pacientes em tratamento com o TPM foram analisadas conforme procedimento descrito, usando os métodos de detecção indireta (DAD) e condutométrica (C⁴D comercial) e os eletroferogramas são apresentados nas **Figuras 23 e 24**, respectivamente.

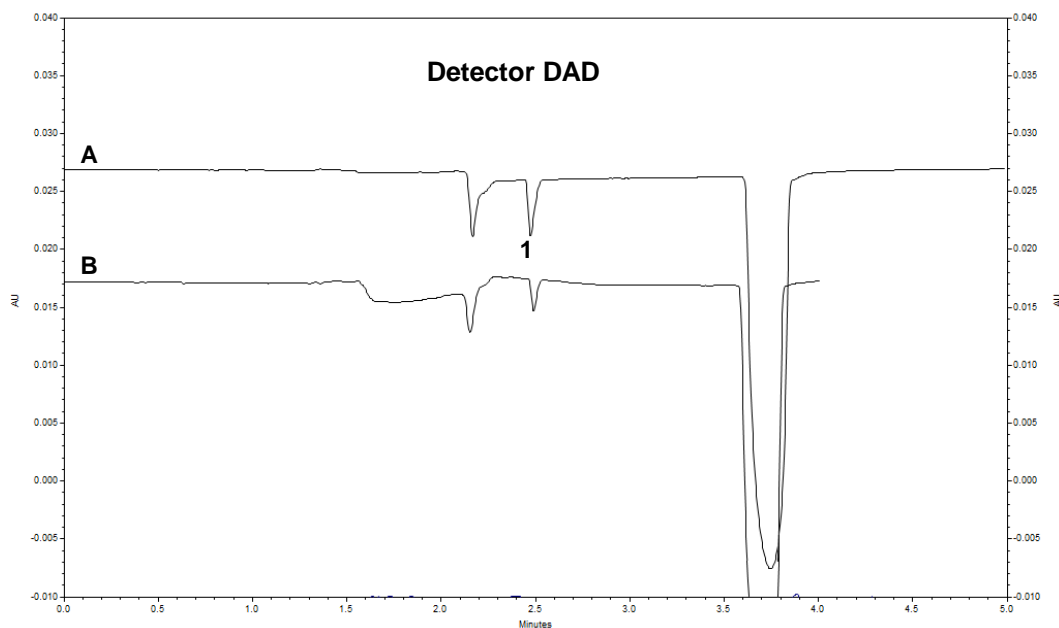


Figura 23. Eletroferograma representativo de uma amostra de plasma de paciente sob tratamento com TPM (A) e amostra de plasma branco fortificado com TPM na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (B). TPM (1)

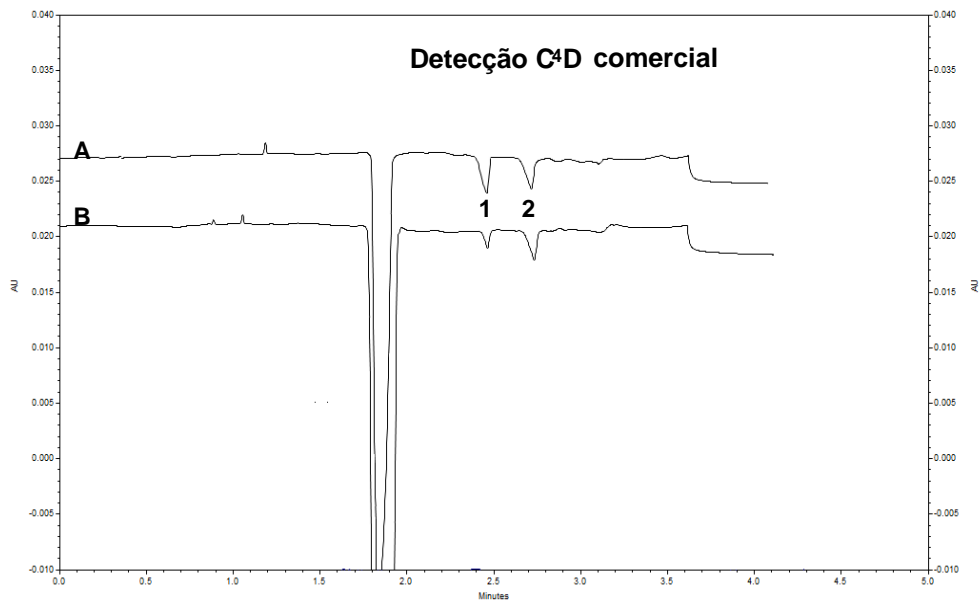


Figura 24. Eletroferograma representativo de uma amostra de plasma de um paciente sob tratamento com TPM (A) e amostra de plasma branco fortificado com TPM na concentração de $10\mu\text{g mL}^{-1}$ (B). TPM (1) e 2 nftol β (2).

A **Tabela 8** apresenta os valores quantitativos das amostras de plasma de 10 pacientes em tratamento com TPM utilizando o método desenvolvido com os detectores DAD e C⁴D comercial e com base no intervalo de referência de concentração terapêutica ($5 - 20 \mu\text{g mL}^{-1}$) (MANDRIOLI et al, 2010) do TPM, 80% dos pacientes apresentaram concentrações plasmáticas abaixo da recomendada, sendo necessária a monitorização destes pacientes para o ajuste de dose.

Tabela 8: Medicamentos coadministrados concomitante com o TPM e quantificação do TPM em pacientes epilépticos utilizando os detectores DAD e C⁴D comercial.

| Pacientes | Fármacos coadministrados | DAD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | C ⁴ D comercial ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|-----------|--------------------------|-------------------------------|--|
| 1 | CLB | 2.52 | 2.04 |
| 2 | CBZ/VPA/LTG | 1.25 | 1.18 |
| 3 | CBZ/VPA/CLB | 1.11 | 1.74 |
| 4 | CBZ/CLB | 1.32 | 1.12 |
| 5 | GBP/PHT/CLB | 1.16 | 1.23 |
| 6 | CBZ | 1.51 | 1.42 |
| 7 | CBZ/CLB | 1.32 | 1.32 |
| 8 | CBZ/LTG/CLB | 9.03 | 8.17 |
| 9 | PHT/CLB | 2.11 | 2.14 |
| 10 | CBZ/CLB | 5.93 | 5.76 |

Clobazam (CLB), carbamazepina (CBZ), ácido valpróico (VPA) gabapentina (GBP), fenobarbital (PHT), lamotrigina (LTG).

A **Figura 25** demonstra um gráfico comparativo entre as amostras dos pacientes analisados com o método do DAD e C⁴D.

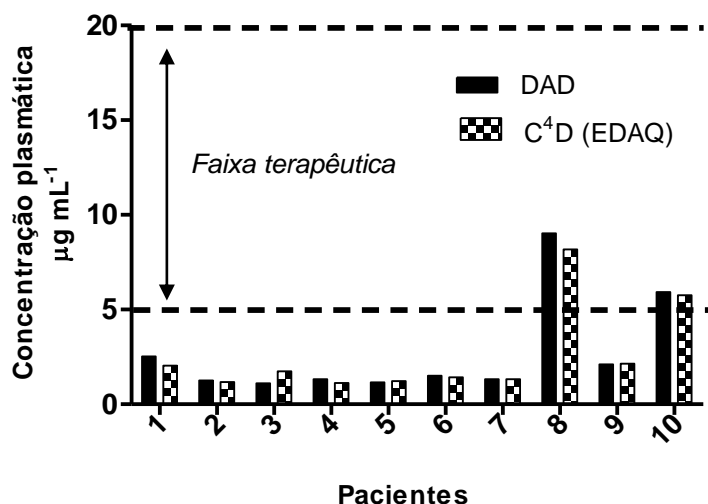


Figura 25. Concentrações plasmáticas de 10 pacientes sob tratamento com TPM, analisados pelo método proposto com os detectores DAD e C⁴D comercial.

4.4. Comparação dos métodos desenvolvidos e validados com detectores DAD e C⁴D Lite

A técnica de CE é uma técnica separação consolidada, tendo em vista a grande quantidade de trabalhos descritos na literatura. Mas, devido à pequena quantidade de amostra introduzida no interior do capilar, os sistemas de detecção continuam em destaque, visando melhoras nos sistemas já conhecidos e introduzindo novos conceitos (da SILVA, 2003).

Este trabalho teve o objetivo de desenvolver e validar um método usando diferentes detectores. Ao longo do desenvolvimento do projeto, adaptações foram necessárias devido à peculiaridade de cada detector. Assim algumas considerações e comparações foram feitas e descritas abaixo. O TPM é uma substância que não possui grupos cromóforos. De acordo com a avaliação realizada em relação à composição do BGE, solução de TEA foi a mais adequada para ambos os métodos desenvolvidos. Entretanto, com a detecção indireta (DAD) foi necessária a adição do DNB como *probe* e do inversor de fluxo, o CTAB foi necessário. O uso de CTAB foi necessário, devido às variações no tempo de migração do TPM. Com os detectores condutométricos (C⁴D Lite e comercial) apenas a TEA foi necessária como BGE, uma vez que estes detectores medem a diferença da condutividade entre o analito e o coíon presente no BGE.

Em relação aos sistemas de detecção, os sistemas ópticos (DAD) necessitam de uma abertura de janela óptica no capilar, o que o fragiliza, podendo levar a ruptura durante seu uso e sua instalação no equipamento. Já os detectores condutométricos (C⁴D Lite e comercial) apresentam dificuldade no posicionamento dos eletrodos e podem levar a perda na reprodutibilidade quando há necessidade de substituição do capilar (FRANCISCO, 2010). Além disso, outros itens podem ser comparados. Os detectores condutométricos apresentam custo bastante inferior quando comparado ao detector óptico (DAD) e pode ser adquirido comercialmente (C⁴D comercial) ou através da montagem do seu próprio detector através do esquema eletrônico e o código da fonte disponibilizado por (Francisco, 2010). Em relação a sensibilidade ambos os detectores permitiram a análise das amostras dos pacientes e os métodos desenvolvidos apresentaram o mesmo LIQ e intervalo linear. Entretanto, o volume de amostra utilizando o detector DAD foi maior em relação ao detector condutométrico, sendo, portanto, este mais vantajoso em relação ao volume

de amostra, a qual nem sempre é disponível em quantidade adequada. Portanto, baseado neste critério pode-se concluir que o detector condutométrico é mais sensível que o óptico. Assim, baseado nas considerações acima, o sistema com detecção condutométrica (detectores C⁴D Lite e comercial) apresentaram vantagens como simplicidade de operação, custo reduzido e sensibilidade adequada sendo um detector promissor para ser incorporado nas análises de rotina em amostras biológicas.

5. CONCLUSÃO

Dois métodos bioanálíticos foram desenvolvidos por eletroforese capilar utilizando os detectores DAD e C⁴D Lite para análise do TPM em amostras de plasma. Após a otimização das condições analíticas para cada método, ambos os métodos (DAD e C⁴D Lite) foram validados segundo as recomendações preconizados pela ANVISA e EMA, apresentando resultados aceitáveis em relação aos parâmetros de seletividade, efeito residual, limite quantificação, linearidade, precisão, exatidão e estabilidades. Além disso os dois métodos foram aplicados nas mesmas amostras de dez pacientes em tratamento com o TPM, onde não foram observadas diferenças significativas nos resultados obtidos entre os dois métodos.

A comparação entre os métodos desenvolvidos neste trabalho utilizando diferentes sistemas de detecção mostra que, apesar da detecção condutométrica não ser tão difundida, esta apresentou vantagens em relação à detecção indireta, como simplicidade, facilidade no preparo do BGE e baixo custo do detector. Além disso, foi demonstrada maior sensibilidade do detector C⁴D ao ser obtido o mesmo valor de LIQ com menor volume de amostra. Assim, o sistema de detecção condutométrica mostrou ser promissor para análise de amostras complexas, como o plasma, apresentando grande potencial para ser usado em análises de rotina.

REFERENCIAS

Agilent capillary electrophoresis system technical description. Disponível em: <https://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/59656512.pdf>.

Acesso em: 20/12/2014

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 mai. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Bulário eletrônico. Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp>. Acesso em out 2014.

ALTRIA, K. D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, operation and applications**. New Jersey: Humana Press, 1996. 349 p.

BAHRAMI, G; MIRZAEI, S.; MOHAMMADI, B.; KIANI, A. High-performance liquid chromatographic determination of topiramate in human serum using UV detection. **Journal Chromatography B**, Netherlands, v. 822, p. 322-325, 2005.

BELL, G. S.; SANDER, J.W.; LI M. L. Prevalence and Pattern of Epilepsy Treatment in Different Socioeconomic Classes in Brazil. **Epilepsia**. Copenhagen, v.48, n. 5, p. 880-885, 2007

BERG, A. T; BERGKOVIC, S. F.; BRODIE, M. J.; BUCHHALTER, J.; CROSS, J. H; BOAS, W. V. E et al. Revised terminology and concepts for organization of epilepsies; report of the Commission on Classification and Terminology, 2005- 2009. **Epilepsia**, New York, v.51, n.4, p.676-85, 2010.

BESAG, F. M.C.; PATSALOS, P. N. New developments in the treatment of partial-onset epilepsy. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, Albany, v. 8, p. 455-464, 2012

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.; OLIVEIRA, A.R.M. Analysis of Chiral Drugs in Body Fluids. In: **Chiral separations by capillary electrophoresis** (Chromatographic science series; v.100), Boca Raton: CRC Press, 2010, 87-108p.

BRITO-NETO, J. G. A.; DA SILVA J. A. F.; BLANES, L.; DO LAGO C. L. Understanding Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary and Microchip Electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, New York, v. 17, n.13, 2005.

CARVALHO, L. M.; SPENGLER, C.; LIMA, A. P. S.; RAABE, A.; MARTINI, M.; NASCIMENTO, P. C. BOHRER, D. Determinação simultânea de cátions empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato em equipamento construído em laboratório. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2203-2208, 2009

COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: Características e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 512-518, 1997.

de GAITANI, C. M.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Capillary electromigration techniques for the analysis of drugs and metabolites in biological matrices: a critical appraisal. In: GARCIA, D. C.; CHUMBIMUNI-TORRES, K.; CARRILHO, E. **Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis**. 2013, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, cap. 12, p.229-245.

da SILVA J. A. F. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 56-64, 2003

da SILVA, J. A. F.; do LAGO, C. L. An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis **Analytical Chemistry**, Washington, v.70, p. 4339-4343, 1998.

DOBLE, P.; HADDAD, P. R. Indirect photometric detection of anions in capillary electrophoresis. **Journal Chromatography A**, New York, v. 834, p. 189-212, 1999.

DOBLE, P.; MACKA, M.; HADDAD, P. R. Design of background electrolytes for indirect detection of anions by capillary electrophoresis. **Trends in analytical chemistry**, Amsterdam, v. 19, n.1, p. 10-17, 2000.

EDAQ. Disponível em: <<http://www.edaq.com/?url=c4d-contactless-conductivity-introduction>>. Acesso em dez 2015.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guiderline on bioanalytical method validation. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. Acesso em 12 nov de 2012.

FALLER, T.; ENGELHARDT, H. How to achieve higher repeatability and reproducibility in capillary electrophoresis. **Journal Chromatography A**, Netherlands, v. 853, n.1-2, p.83-94, 1999.

FIGUEREDO, R.; TREVISOL-BITTENCOURT, P.C.; FERRO, J.B.M. Estudo clínico epidemiológico de pacientes com epilepsia mioclônica juvenil em Santa Catarina. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v. 57, n. 2b, p. 401-404, 1999.

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J. H.; ELGER, C. E. ENGEL, J. J; FORSGREN, L.; FRENCH, J. A.; GLYNN, M.; HESDORFFER, D. C.; LEE, B.I.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L.; PERUCCA, E.; SCHEFFER, I. E.; TORBJORN, T.; WATANABE, M.; WIEBE, S. A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**. Copenhagen, v. 55, n. 4, p. 475-482, 2014

FISHER, R. S; BOAS, W. V. E; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. R. Epileptic seizures and seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**. New York, v. 46, n.4, p.470-72, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA – Medication Guide. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/020844s041lbl.pdf> Acesso em 20 nov 2015a.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA – Medication Guide. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/UCM312590.pdf>> Acesso em 23 nov 2015b.

FRANCISCO, K. J. M. Implementação e otimização de detector condutométrico sem contato para eletroforese capilar. 2010. 132 p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FREGNI, F., PASCUAL-LEONE, A.; VALENTE, K.D.R. Uma Janela Terapêutica Para a Estimulação Magnética Transcraniana na Epilepsia Refratária. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, Porto Alegre, v.11, n.4, p.177-181, 2005.

FURUSAWA, K.; SAITO, A.; SHIRAI, J.; NASHIMA, T. Depletion Flocculation of Latex Dispersion in Ionic Micellar Systems. **Journal of Colloid and Interface Science**. New York, v. 253, p. 273–278, 2002.

GARZON, E. Epilepsia refratária: Conceito e contribuição de novas drogas antiepilépticas e de outras modalidades terapêuticas. **Neurosciências**, São Paulo, v. 10 (2), p. 66-82, 2002.

GUERREIRO, C. A. M. História do surgimento e desenvolvimento das drogas antiepilépticas. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*. Porto Alegre, v. 12, p.18-21, 2006.

HAHN, R. Z.; KREUTZ, O. C.; ANTUNES, M. V.; LINDEN, R.; da SILVA, J.; da SILVA, C. A. Determinação simultânea de topiramato, carbamazepina, fenitoína e fenobarbital em plasma empregando cromatografia a gás com detector de nitrogênio e fósforo. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 5, 2013

ISTECH. Disponível em <http://www.istech.at/ce_unit.htm>. Acesso em dez 2015.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: Fundamentos e aplicações, **Química nova**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001

KHALEDI, M. G.; SMITH, S. C.; STRASTERS, J. K. Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography of Acidic Solutes: Migration Behavior and Optimization Strategies. **Analytical Chemistry**. Washington, v. 63, p.1820-1830, 1991.

KLOCKOW-BECK, A.; NICK, A.; GEISSHUESLER, S.; SHAUFERLBERGER, D. Determination of the inorganic degradation products sulfate and sulfamate in the antiepileptic drug topiramate by capillary electrophoresis. **Journal Chromatography B**, Amsterdam, v. 720, n. 1-2, p.141-151, 1998.

KUBAN, P.; HAUSER, P. C. A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, p. 15-29, 2008.

KUMAR, D G. Estimation of Topiramate in human plasma using LC–MS/MS method. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. Indore, v. 6, p. 217-220, 2013. Supplement 3.

KWAN, P.; BRODIE, M. Early identification of refractory epilepsy. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 342, p. 314-319, 2000.

LI M. L.; FERNANDES, P. T.; NORONHA, A. L.A.; MARQUES, L. H.N.; BORGES, M. A.; CENDES, F.; GUERREIRO, C. A.M.; ZANETTA, D. M.T.; de BOER, H. M.; ESPÍNDOLA, J., MIRANDA, C. T.; PRILIPKO, L.; SANDER, J. W. Demonstration project on epilepsy in Brazil. **Arquivos Neuropsiquiatria**. São Paulo, v.65, p.5-13, 2007.

MAMENISKIENE, R.; SAKALAUŠKAITE-JUODEIKIENE, E; BUDRYS, V. People with epilepsy lack knowledge about their disease. **Epilepsy & Behavior**. San Diego, v. 46, 192–197, 2015.

MANDRIOLI, R.; MUSENGA, A.; KENNDLER, E.; DE DONNO, M.; AMORE, M.; RAGGI, M.A. Determination of topiramate in human plasma by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 53, p.1319–1323, 2010.

MARCHI, G.; SILVA, C. A.; GUILHERME, L. R. G.; PIRES, A. M. M.; GUERREIRO, M. C. **Princípios da determinação de íons em amostras ambientais por eletroforese capilar**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007, 76 p.

MARQUES, F. A. Monitorização terapêutica do topiramato em pacientes com epilepsia refratária. 2015. 88 p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MARTINC, B.; ROSKAR, R.; GRABNAR, I.; VOVK, T. Simultaneous determination of gabapentin, pregabalin, vigabatrin, and topiramate in plasma by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 962, p. 82-88, 2014.

MAYER, B. X. How to increase precision in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 907, p. 21-37, 2001.

NORONHA, A. L. A.; BORGES, M. A.; MARQUES, L. H. N.; ZANETTA, D. M. T.; FERNANDES, P. T.; DE BOER, H.; ESPÍNDOLA, J.; MIRANDA, C. T.; PRILIPKO, L.; OGUNI, N. Diagnosis and treatment of epilepsy. **Epilepsia**, Copenhagen, v.45, p. 13-16, 2004. Supplement 8.

Open Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector – OpenC4D.2011

PARK, J. H.; PARK, Y. S.; LEE, M. H.; RHIM, S. Y.; SONG, J. C.; LEE, S. J.; KIM, J. M.; SHAW, L. M.; KANG, J. S. Determination of plasma topiramate concentration using LC–MS/MS for pharmacokinetic and bioequivalence studies in healthy Korean volunteers, **Biomedical. Chromatography**, England, v. 22, p. 822-829, 2008.

PATSALOS P. N.; FRÖSCHER, W.; PISANI, F.; van RIJN, C. M. The importance of drug interactions in epilepsy therapy. **Epilepsia**, Copeganhen, v. 43, n. 4, p. 365-85, 2002.

PATSALOS, P.N.; BERRY, D.J.; BOURGEOIS, B.F.D.; CLOYD, J.C.; GLAUSER, T. A. Antiepileptic drugs - best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, Copenhagen, v. 49, n.7, p.1239-1276, 2008.

QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

QUEIROZ, S. C. N.; JARDIM, I. C. S. F. Em CHEMKEYS. Disponível em http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elec_4/fluele_2/fluele_2.htm Acesso em: 10 dez 2014

REYNOLDS, E.H. The ILAE/IBE/WHO epilepsy global campaign history. International League Against Epilepsy. International Bureau for Epilepsy. **Epilepsy**, New York, v.43, n.6, p.9-11, 2002.

ROSENFELD, W.E. Topiramate: A review of preclinical, pharmacokinetic, and clinical data. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v. 19, .n. 6, 1997.

SAITO, R. M. Fundamentos, Produção e Aplicação de Marcas Térmicas em Eletroforese Capilar. 2011. 153 p. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANTOS, M. R.; TAVARES, M. F. M.; RUBIM, J. C. Implementação de um sistema de eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser. **Química nova**, São Paulo, v. 23, n. 5, 2000.

SCHEFFER, I. E.; BERKOVIC, S. F.; CAPOVILLA,G.; CONNOLLY, M. B.; GUILHOTO, L.; HIRSCH, E.; MOSHE,S. L.; NORDLI, D.; ZHANG, H.; ZUBERI, S. M. The Organization of the Epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology. Disponível em <http://www.ilae.org/Visitors/Centre/Documents/OrganizationEpilepsy.pdf>. Acesso em: 10 jan 2015.

SHANK R.P; GARDOCKI, J.F; STREETER, A. J.; MARYANOFF, B.E. An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. **Epilepsia**, Copenhagen, v.41, p. S3-S9, 2000.

SHANK, R. P.; DOOSE, D. R.; STREETER A. J.; BIALER, M. Plasma and whole blood pharmacokinetics of topiramate: the role of carbonic anhydrase. **Epilepsy research**, Netherlands, v. 63, p. 103-112, 2005.

SUNTORNUSUK, L. Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis: A Survey on Recent Applications, United States, **Journal of Chromatographic Science**. v. 45, 2007.

SUBRAMANIAN, M.; BIRNBAUM, A. K.; REMMEL, R. P. High speed simultaneous determination of nine antiepileptic drugs by liquid chromatography–mass spectrometry. **Therapeutic drug monitoring**, New York, v. 30, p. 347-356, 2008.

TAVARES, M. F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, v.19, n. 2, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

VAHORA, D.; SARAOGI, M. A.; YAZDANI, M.; BHOWMIK, R.; KHANAN, K.; PILLAI, K.K. Recent advances in adjunctive therapy for epilepsy: focus on sodium channel blockers as third generation antiepileptic drugs. **Drugs of Today**. Barcelona, v.46, n. 4, p. 265-277, 2010.

van HOUT, M. W. J.; NIEDERLANDER, H. A. G.; ZEEUW, R. A.; de JONG, G.J. New developments in integrates sample preparation for bioanalysis. In: WILSON, L. D. **Handbook of Analytical Separations. Bioanalytical Separations**. 2005, Elsevier Science, Amsterdam, cap. 1, v. 4, p. 1-40 C⁴D

VITOR, A. P. Determinação de aminoácidos por eletroforese capilar com detecção UV/vis para o estudo do perfil metabólico urinário do refluxo vésico-uretral. 2012. 92 p. Dissertação (mestrado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

WEINBERGER, R. **Practical capillary electrophoresis**. Academic Press. Boston, 2000, 17-43 p.

WELLS, D.A. High Throughput Bioanalytical Sample Preparation: Methods and Automation Strategies. .In: **Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v.5. Amsterdam: Elsevier, 2003, 628 p.

WREN, S. The Principles of Separation in CE. **Chromatographia**, v. 54, 2001. Supplement S-15-S-23

ZEMANN, A. J.; SCHNELL, E.; VOLGGER, D.; GUNTHER, BONN, K. Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**,

Washington, v. 70, p. 563-567, 1998. Princípios da determinação de íons em amostras ambientais por eletroforese capilar.