UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da eletroforese capilar para quantificação do
nebivolol em forma farmacêutica sólida e análise
enantiosseletiva da ligação do nebivolol às proteínas
plasmáticas**

Ana Débora Nunes Pinheiro

RIBEIRÃO PRETO

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da eletroforese capilar para quantificação do nebivolol em forma farmacêutica sólida e análise enantiosseletiva da ligação do nebivolol às proteínas plasmáticas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

**Orientada: Ana Débora Nunes Pinheiro
Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani.**

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica em 02/03/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

RIBEIRÃO PRETO

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Nunes Pinheiro, Ana Débora

Avaliação da eletroforese capilar para quantificação do nebivolol em forma farmacêutica sólida e análise enantiosseletiva da ligação do nebivolol às proteínas plasmáticas. Ribeirão Preto, 2015.103f.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: de Gaitani, Cristiane Masetto.

1. Nebivolol;
2. Eletroforese capilar;
3. Enantiômeros;
4. Carboxi-metil- β -ciclodextrina;
5. FASS;
6. FASI.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Débora Nunes Pinheiro

Avaliação da eletroforese capilar para quantificação do nebivolol em forma farmacêutica sólida e análise enantiosseletiva da ligação do nebivolol às proteínas plasmáticas.

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas para obtenção
do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração:
Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Cristiane Masetto de
Gaitani

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Aos meus pais, Francisco e Diana, que me deram a luz da vida.
E ao meu irmão, João Francisco, que mantém essa chama acesa.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelos dons que me foram dados.

Aos meus pais, Francisco Geraldo e Diana Célia, pelo amor incondicional, sem eles nada teria sido possível. Por terem me ensinado os verdadeiros valores e me mostrado, com exemplos, o que de fato é importante nessa vida. Além de pais exemplares são mestres e doutores, e plantaram em mim o amor pela ciência. Obrigada pelo incentivo de sempre, pelo carinho e por me mostrarem que tudo tem solução. Amo vocês.

Ao meu irmão, João Francisco, pela amizade e pelo apoio. Por entender esse tempo que passei longe de casa e por me receber tão bem quando vou a Fortaleza. Obrigada pelo riso contagiante e por aquele abraço que só você sabe dar. Te amo, *brother*!

À orientadora Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani, pela orientação durante o curso de mestrado e por dividir seus conhecimentos e experiências comigo.

Ao Prof. Dr. Anderson de Oliveira por disponibilizar a estrutura de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Michael Breadmore, por me receber tão bem em seu laboratório na Universidade da Tasmânia.

Aos amigos Prof. Dr. Humberto Carmona, Profa. Dra. Maria da Guia e Dr. Francisco Albano de Menezes pelas valiosas sugestões.

À amiga Greyce Kelly, não só pela amizade, mas por todas as risadas, choros e até pelas discussões mais sem sentido no laboratório. Pelo apoio profissional e pessoal. Você se tornou uma grande amiga!

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto: Aline, Bruna, Fernando, Jennifer, Lanuze, Larissa, Luciana, Luiza e Rodrigo, pelas horas compartilhadas e momentos de descontração. Aos técnicos, Ivelise, Luis Fernando, Mariana e Maíra pelo suporte.

Aos colegas do ACROSS na Austrália, por dividirem conhecimento e fazerem com que eu me sentisse parte do grupo “*CErs and CHIPers*”. Em especial à amiga Umme Mena, por me auxiliar em diversos momentos.

Aos amigos que se tornaram minha família em Ribeirão Preto, em especial Camylla Silva, Rebeca Pessoa, Thaís Mantovani e Rafaela Batisti.

Ao Rodolfo Georgii. Obrigada pelo suporte e apoio na fase final do curso de mestrado. Não apenas por me ajudar a realizar esse sonho, mas também por me incentivar a traçar novas metas e buscar novos sonhos comigo.

Aos professores da pós-graduação pelos conhecimentos transmitidos.

À CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

À FAPESP pela bolsa de mestrado.

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade.

*“Sem sonhos, a vida é uma manhã sem orvalhos,
um céu sem estrelas, um oceano sem ondas,
uma vida sem aventura, uma existência sem sentido.”*

Augusto Cury

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1 Influência da composição da solução de eletrólitos sobre o tempo de migração do nebivolol.	30
Tabela II.2 Influência do pH sobre o tempo de migração e eficiência do nebivolol.	31
Tabela II.3 Teste de conformidade do sistema para a análise do nebivolol.	36
Tabela II.4 Resultados da ANOVA para o modelo dos mínimos quadrados.	40
Tabela II.5 Valores de LD e LQ para análise do nebivolol.	41
Tabela II. 6 Precisão intra e interdica do método para análise do nebivolol.	41
Tabela II. 7 Exatidão intra e interdica do método para análise do nebivolol.	42
Tabela II.8. Determinação de nebivolol em amostras de comprimidos comerciais.	42
Tabela III.1 Influência do tipo de CD sobre o tempo de migração e a resolução entre os enantiômeros do nebivolol.	58
Tabela III.2 Influência da adição de solventes orgânicos sobre o tempo de migração e a resolução dos enantiômeros do nebivolol.	59
Tabela III.3 Condições analíticas estabelecidas para a separação enantiomérica do nebivolol.	65
Tabela III.4 Efeito do meio de dissolução da amostra sobre as áreas dos enantiômeros do nebivolol em FASS.	67
Tabela III.5. Efeito do tempo de injeção sobre a resolução (R_s) e a área dos enantiômeros em FASS.	68

LISTA DE FIGURAS

	2
Figura I.1 Sistema de CE.	
Figura I.2 Perfil de fluxo gerado por pressão - HPLC (A) e perfil de fluxo eletroosmótico - CE (B).	4
Figura I.3 Simulação de injeções hidrodinâmica (A) e eletrocinética (B) de uma mistura de cátions e ânions em condições sem EOF.	6
Figura I.4 Desenho esquemático de uma molécula quiral com carbono assimétrico.	10
Figura I.5 Diferenças estruturais entre as CDs nativas α , β e γ .	13
Figura II.1 Estrutura química do nebivolol	21
Figura II.2 Influência da concentração da solução tampão sobre o tempo de migração do nebivolol(n=3, p<0,05).	32
Figura II.3 Influência da temperatura de análise sobre o tempo de migração do nebivolol (n=3, p<0,05).	33
Figura II.4 Influência da tensão aplicada sobre o tempo de migração do nebivolol (n=3, p<0,05).	34
Figura II.5 Eletroferograma referente à análise do nebivolol por CE.	35
Figura II.6 Eletroferograma obtido após degradação forçada por hidrólise ácida do padrão analítico de nebivolol.	37
Figura II.7 Eletroferograma obtido após degradação forçada por hidrólise básica do padrão analítico de nebivolol.	38
Figura II.8 Eletroferograma obtido após degradação forçada por hidrólise neutra do padrão analítico de nebivolol.	38
Figura II.9 Eletroferograma obtido após degradação forçada por oxidação química do padrão analítico de nebivolol.	39

Figura II.10 Gráfico de resíduos do método analítico.	40
Figura II.11. Eletroferograma referente à análise de comprimidos de nebivolol 5 mg.	43
Figura III.1 Influência da concentração do tampão sobre: A) resolução dos enantiômeros do nebivolol; B) tempo de migração dos enantiômeros do nebivolol.	60
Figura III.2 Influência da concentração da CM- β -CD sobre: A) resolução dos enantiômeros do nebivolol; B) tempo de migração dos enantiômeros do nebivolol.	61
Figura III.3 Influência da temperatura de análise sobre: A) tempo de migração dos enantiômeros do nebivolol; B) resolução dos enantiômeros do nebivolol.	63
Figura III.4 Influência da tensão aplicada sobre: A) tempo de migração dos enantiômeros do nebivolol; B) resolução dos enantiômeros do nebivolol.	64
Figura III.5 Eletroferograma referente à análise enantiosseletiva do nebivolol por CE.	66
Figura III.6 Eletroferograma referente à análise enantiosseletiva do nebivolol em diferentes meios de dissolução da amostra por FASS; (a) tampão acetato de sódio 50 mM (1:10) e (b) metanol:água (1:4).	67
Figura III.7 Eletroferograma referente à análise dos enantiômeros do nebivolol após <i>stacking</i> por FASS, amostra dissolvida em metanol:água (1:4, v/v).	69
Figura III.8 Eletroferograma referente à análise dos enantiômeros do nebivolol após <i>plug</i> de água (injeção hidrodinâmica 0,5 psi por 5 s) e injeção por EKI.	70
Figura III.9 Efeito da tensão e do tempo de injeção em FASI, sobre a resolução (a) e área dos enantiômeros do nebivolol (b) e (c).	71
Figura III.10 Eletroferograma referente à análise dos enantiômeros do nebivolol após <i>stacking</i> por FASI.	72
Figura III.11. Eletroferograma referente à análise enantiosseletiva da fração ligada do nebivolol à HSA ($t_{RSS} = 24,431$ min, $t_{SRR} = 25,262$ min; $R_s = 0,79$).	73
Figura III.12. Eletroferograma referente à análise enantiosseletiva da fração livre do nebivolol à HSA ($t_{RSS} = 20,892$ min, $t_{SRR} = 20,467$ min; $R_s = 1,11$).	74

RESUMO

PINHEIRO, A. D. N. **Avaliação da eletroforese capilar para quantificação do nebivolol em forma farmacêutica sólida e análise enantiosseletiva da ligação do nebivolol às proteínas plasmáticas.** 2015. 100f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O nebivolol é um fármaco anti-hipertensivo, comercializado na forma de uma mistura equimolar dos enantiômeros RSSS e SRRR-nebivolol. Esses dois enantiômeros possuem propriedades farmacológicas distintas, o que sugere uma farmacocinética diferente entre ambos. Sendo assim, foram desenvolvidos dois métodos para a análise do nebivolol por eletroforese capilar (CE), um aquiral e outro quiral. O primeiro consistiu em um método para análise de forma farmacêutica comercial de comprimidos de nebivolol. Foram definidas as seguintes condições analíticas: capilar de sílica fundida 50 µm de diâmetro interno (d.i) e 38 cm de comprimento efetivo (c.ef), eletrólito de corrida composto por tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0, temperatura de 30 °C, tensão de 30 kV e detecção a 200 nm. O método desenvolvido permitiu a análise rápida e eficiente de comprimidos comerciais de nebivolol, sendo simples, seletivo, preciso e exato, está em conformidade com o guia de validação de métodos analíticos da ANVISA (2003), e foi aplicado para quantificação de comprimidos comerciais de nebivolol. O segundo método teve como objetivo realizar a análise enantiosseletiva da ligação do nebivolol à albumina humana do soro (HSA). Após a avaliação de diversos parâmetros, foram estabelecidas as seguintes condições analíticas: capilar de sílica fundida 50 µm d.i e 38 cm c.ef, eletrólito de corrida composto por tampão acetato de sódio 50 mM, carboxi-metil-β-ciclodextrina 12,5 mM, 1% acetonitrila, pH 4,0, temperatura de 25 °C, tensão de 25 kV e detecção a 200 nm; e como técnica de *stacking* foi utilizada *field amplified sample injection* com *plug* de água (5 psi, 5 s) e injeção eletrocínica 5 kV por 30 s. Nesta condição foi obtida uma resolução de 1,58 e tempo de análise inferior a 25 minutos. No estudo de ligação à HSA foi observado que há enantiosseletividade na ligação, porém, este estudo ainda precisa ser melhor delineado em relação às concentrações de proteína e analito, bem como tempo de incubação e procedimento de filtração para separação das frações livre e ligada.

Palavras-chave: nebivolol, eletroforese capilar, enantiômeros, carboxi-metil-β-ciclodextrina, FASS, FASI.

ABSTRACT

PINHEIRO, A. D. N. **Evaluation of capillary electrophoresis for the nebivolol quantification in solid pharmaceutical forms and enantioselective analysis of nebivolol binding to plasmatic proteins.** 2015. 100p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Nebivolol is an anti-hypertensive drug, commercialized as a racemic mixture of RSSS and SRRR-nebivolol. Both enantiomers have distinct pharmacological properties, what suggests a different pharmacokinetics between them. Therefore, it was developed two methods for the nebivolol analysis by capillary electrophoresis (CE), one of them is achiral and the other is chiral. The first method aimed the analysis of tablets. The analytical conditions were determined: silica fused capillary 50 μm internal diameter (i.d.) and 38 cm effective length (ef. l.), running electrolyte composed by 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.0, 30 $^{\circ}\text{C}$ temperature, 0 kV applied voltage and 200 nm UV detection. The developed method allowed a quickly and efficient tablets analysis, being simple, selective, accurate and precise, and it is also in accordance with ANVISA (2003) analytical methods validation guide, and it was applied to the quantification of nebivolol in tablets. The second method aimed to analyze the enantioselective nebivolol binding to HSA. After the evaluation of many parameters, it was established the following analytical conditions: 50 μm i.d. and 38 cm ef.l. fused silica capillary, running electrolyte composed by 50 mM sodium acetate buffer, 12.5 mM carboxymethyl- β -cyclodextrin, acetonitrile 1%, pH 4.0, 25 $^{\circ}\text{C}$, 25 kV applied voltage and 200 nm UV detection; and as stacking technique it was applied field amplified sample injection with water plug (5 psi, 5 s) and 5 kV for 30 s electrokinetic injection. At this condition, it was possible to achieve 1.58 resolution and less than 25 minutes of analysis. At the HSA binding study, it was observed an enantioselectivity on the binding; however this study still needs better design in concern to analyte and protein concentration, as well as, incubation time and filtration procedure to the separation of bound and free fractions.

Key-words: nebivolol, capillary electrophoresis, enantiomers, carboxymethyl- β -cyclodextrin, FASS, FASI.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CAPITULO I - INTRODUÇÃO GERAL	
1 INTRODUÇÃO	1
I.1.1 EQUIPAMENTO DE CE	2
<i>I.1.1.1 Capilares</i>	2
I.1.2 PRINCÍPIO DE SEPARAÇÃO	3
I.1.3 TIPOS DE INJEÇÃO	5
<i>I.1.3.1 Injeção hidrodinâmica</i>	5
<i>I.1.3.2 Injeção eletrocinética</i>	6
I.1.4 TÉCNICAS DE <i>STACKING</i>	7
<i>I.1.4.1 Field amplified sample stacking– FASS</i>	8
<i>I.1.4.2 Field amplified sample injection – FASI</i>	8
I.1.5 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA	9
<i>I.1.5.1 Compostos quirais</i>	10
<i>I.1.5.2 Separação Enantiosseletiva em CE</i>	11
<i>I.1.5.2.1 Ciclodextrinas</i>	11
I.2 OBJETIVO GERAL	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

CAPÍTULO II. ANÁLISE DE COMPRIMIDOS DE NEBIVOLOL POR CE

II.1 INTRODUÇÃO	21
II.2 OBJETIVOS	23
II.2.1 OBJETIVO GERAL	23
II.2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	23
II.3 MATERIAL E MÉTODOS	24
II.3.1 EQUIPAMENTOS	24
II.3.2 REAGENTES E SOLVENTES	24
II.3.3 CAPILAR	25
II.3.4 SOLUÇÕES PADRÃO	25
II.3.5 ANÁLISE DO NEBIVOL POR CE	25
II.3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CE	26
<i>II.3.6.1 Conformidade do sistema</i>	26
<i>II.3.6.2 Seletividade</i>	26
<i>II.3.6.3 Linearidade</i>	27
<i>II.3.6.4 Limites de detecção e quantificação</i>	27
<i>II.3.6.5 Precisão e exatidão</i>	28
II.3.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE COMPRIMIDOS DE NEBIVOLOL	29
<i>II.3.7.1 Preparo das amostras de comprimidos de nebivolol</i>	29
II.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
II.4.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS PARA ANÁLISE DO NEBIVOLOL	30
<i>II.4.1.1 Eletrólito de corrida</i>	30
<i>II.4.1.2 Avaliação do pH</i>	31

<i>II.4.1.3 Avaliação da concentração do tampão</i>	32
<i>II.4.1.4 Avaliação da temperatura</i>	33
<i>II.4.1.5 Avaliação da tensão aplicada</i>	34
<i>II.4.1.6 Condições de separação otimizadas</i>	34
<i>II.4.1.7 Avaliação da eletrólise do eletrólito de corrida</i>	35
II.4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	36
<i>II.4.2.1 Conformidade de sistema</i>	36
<i>II.4.2.2 Seletividade</i>	37
<i>II.4.2.3 Linearidade, LD e LQ</i>	39
<i>II.4.2.4 Precisão</i>	41
<i>II.4.2.5 Exatidão</i>	41
II.4.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE COMPRIMIDOS DE NEBIVOLOL	41
II.5 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPÍTULO III. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA LIGAÇÃO DO NEBIVOLOL ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS POR CE	
III.1 INTRODUÇÃO	50
III.2 OBJETIVOS	52
III.2.1 OBJETIVO GERAL	52
III.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
III.3 MATERIAL E MÉTODOS	53
III.3.1 EQUIPAMENTOS	53
III.3.2 REAGENTES E SOLVENTES	53
III.3.3 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS PARA ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DO NEBIVOLOL	53

<i>III.3.3.1 Capilar</i>	53
<i>III.3.3.2 Separação dos enantiômeros do nebivolol</i>	53
<i>III.3.3.3 Ordem de Migração</i>	54
III.3.4 AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE <i>STACKING</i>	54
<i>III.3.4.1 FASS</i>	54
<i>III.3.4.2 FASI</i>	55
III.3.5 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA LIGAÇÃO DO NEBIVOLOL À HSA POR CE	55
III.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
III.4.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS PARA ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DO NEBIVOLOL	57
<i>III.4.1.1 Seletor quiral</i>	57
<i>III.4.1.2 Adição de solvente orgânico</i>	58
<i>III.4.1.3 Avaliação da concentração do tampão</i>	59
<i>III.4.1.4 Avaliação da concentração da CM-β-CD</i>	61
<i>III.4.1.5 Avaliação do pH</i>	62
<i>III.4.1.6 Avaliação da temperatura</i>	62
<i>III.4.1.7 Avaliação da tensão aplicada</i>	63
III.4.2 DETERMINAÇÃO DA ORDEM DE MIGRAÇÃO	65
III.4.3 TÉCNICAS DE <i>STACKING</i>	66
<i>III.4.3.1 FASS</i>	66
<i>III.4.3.2 FASI</i>	69
III.4.4 ESTUDO ENANTIOSSELETIVO DA LIGAÇÃO DO NEBIVOLOL À HSA POR CE.	73
III.5 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

IV.CONCLUSÃO GERAL

IV.1 CONCLUSÃO

81

CAPITULO I

INTRODUÇÃO GERAL

I.1 INTRODUÇÃO

As técnicas analíticas de separação são fundamentais às análises farmacêuticas e biotecnológicas. Devido ao aumento constante de novas substâncias no processo de desenvolvimento de fármacos, há um aumento na demanda por métodos analíticos simples, rápidos, eficientes e econômicos. Por essa razão, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas com atenção especial à redução do tempo de análise (BONATO et al., 2005).

Neste contexto, a eletroforese capilar (CE, do inglês, *capillary electrophoresis*) é uma técnica que surgiu no final dos anos 60 (HJERTÉN, 1967) e foi introduzida como técnica instrumental em 1981, por Jorgenson e Lukacs, que demonstraram separações de compostos que antes pareciam impossíveis. A utilização de capilares de dimensões bastante reduzidas aumentou bastante a superfície em relação ao volume, diminuindo o aquecimento devido a tensões elevadas, além de o aumento surpreendente da eficiência e da capacidade de separação ter estimulado um interesse crescente entre a sociedade científica para executar novos desenvolvimentos na técnica. O primeiro aparelho comercial de CE foi disponibilizado em 1988 e, a partir de então, a técnica vem evoluindo bastante e sendo cada vez mais utilizada na rotina laboratorial.

A CE apresenta como principal vantagem em relação à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *high performance liquid chromatography*) maior eficiência, menor consumo de reagentes e menores tempos de análise (PASCALI et al., 2012). Diferentemente das técnicas cromatográficas, a separação dos compostos em CE ocorre com base na diferença entre as mobilidades de espécies iônicas ou ionizáveis, que estão relacionadas com a razão carga-massa, e a estrutura molecular dos compostos (TAVARES, 2000), e não na distribuição entre duas fases imiscíveis (HANSEN et al. 2011). Apesar de atualmente a CE ser considerada uma poderosa ferramenta analítica, ela apresenta uma desvantagem, quando comparada à HPLC, em relação à falta de detectabilidade. Isto ocorre devido ao curto caminho óptico de detecção, que se resume ao próprio diâmetro interno do capilar, quando se utiliza detectores DAD/UV, e também ao pequeno volume de amostra injetado (BREADMORE, 2009; BONATO, 2010; QUIRINO; TERABE, 2000). Uma das estratégias para minimizar o problema na detecção é a utilização de detectores mais sensíveis como, por exemplo, o detector de fluorescência induzida a laser, espectômetro de massas ou eletroquímico. Além disso, diferentes técnicas de injeção da amostra no capilar podem ser feitas com o objetivo de promover o empilhamento (*stacking*) da mesma. Neste caso, o

stacking ocorre dentro do capilar como parte do processo de separação, sendo uma estratégia bastante interessante para melhorar a detectabilidade (BONATO, 2010).

I.1.1 EQUIPAMENTO DE CE

O equipamento de CE é bastante simples. Ele é composto por uma fonte de alta tensão conectada por dois eletrodos de platina a dois reservatórios contendo uma solução de eletrólitos, além de um capilar com passagem completa por um centro óptico de um sistema de detecção, conectado a um receptor de dados, e um sistema de introdução da amostra, o qual é controlado por um computador (**Figura I.1**) (WEINBERGER, 2000).

Os capilares utilizados em CE possuem dimensões variadas, dependendo do método utilizado. A fonte de alta tensão é capaz de aplicar uma diferença de potencial de até 30 kV, onde é possível gerar corrente elétrica de até 300 μA (TAGLIARO et al., 1998).

Figura I.1. Sistema de CE (adaptado de WEINBERGER, 2000).

I.1.1.1 Capilares

Em CE, o capilar é o local onde ocorrem as separações. O capilar deve ser quimica e fisicamente resistente, seu diâmetro interno deve ser preciso, transparente à radiação UV e bom dissipador de calor (TAGLIARO et al., 1998). Entre os vários materiais utilizados na fabricação de capilares, a sílica fundida, uma forma pura de dióxido de silício amorfo, é o que vem sendo mais utilizado. Este material confere aos capilares propriedades como: dimensões

precisas, alta constante dielétrica, baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica, resistência mecânica – devido a um revestimento externo de poliimida, maleabilidade, resistência ao ataque químico e alta transmitância (TAVARES, 1996; WEINBERGER, 2000). A superfície interna do capilar pode ser revestida ou não. Quando não revestida, os grupos silanóis estão em contato direto com os analitos e as soluções de eletrólitos. Já quando há um revestimento, geralmente de polímeros, ocorre uma blindagem dos grupos silanóis. No local da detecção, o capilar precisa ser transparente, ou seja, é necessário que seja feita a remoção da camada externa de poliimida.

A CE é uma técnica bastante versátil, sendo utilizada para determinar o perfil físico-químico (pK_a , viscosidade, constante de dissociação) de compostos (LIN et al., 2004; FRANÇOIS et al., 2006), separação de compostos quirais (CASLAVSKA; THORMANN, 2011; ASENSI-BERNARDI et al., 2011a; ASENSI-BERNARDI et al., 2011b ; ZHANG et al., 2012; MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2012) e análise de produtos farmacêuticos (PROKHOROVA et al., 2010), além de ter ganhado destaque por sua utilização em análise de material biológico (PASCALI, 2012).

I.1.2 PRINCÍPIO DE SEPARAÇÃO

A seletividade em CE é obtida pela diferença na mobilidade do soluto, que é dependente da sua carga e tamanho e da viscosidade do meio (HANSEN et al., 2011). A mobilidade eletroforética, μ_e , pode ser expressa pela equação I.1:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}, \quad \text{equação I.1 (KNOX, 1994);}$$

onde: q = carga do íon, η = viscosidade da solução e r = raio do íon hidratado.

E a velocidade de migração, pela equação I.2:

$$v = \mu_e E, \quad \text{equação I.2 (KNOX, 1994);}$$

onde: E = campo elétrico aplicado.

O movimento eletroforético é inerente à espécie iônica, de forma que na presença de um campo elétrico, os cátions são atraídos para o cátodo e os ânions para o ânodo. Assim, a

mobilidade do íon aumenta com a carga, mas diminui com o aumento do raio iônico hidratado e da viscosidade do meio (equação 1.1). Portanto, íons pequenos apresentam maiores velocidades que os íons maiores e quanto maior for o número de cargas no íon, também maior será a sua mobilidade (equação 2).

Outro fenômeno que contribui para a separação de analitos em CE é o fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês, *electroosmotic flow*). O perfil do EOF caracteriza a maior vantagem da CE em relação à HPLC. Em cromatografia líquida, devido ao uso de bombas, o fluxo apresenta um perfil parabólico ou laminar (**Figura 1.2 A**) ocasionando um alargamento das bandas. Já em CE, o perfil do EOF é plano (**Figura 2 B**) resultando em uma velocidade uniforme das moléculas pelo capilar causando menor dispersão da amostra e, portanto, maior eficiência (HANSEN et al., 2011).

Figura 1.2. Perfil de fluxo gerado por pressão - HPLC (A) e perfil de fluxo eletrosmótico - CE (B).

Em CE, o EOF se deve à ionização dos grupos silanóis presentes na parede do capilar. Os silanóis apresentam, em média, caráter ácido ($pK_a \sim 2,5$). Quando em condições de pH acima do valor de pK_a , os silanóis se dissociam (SiO^-) formando uma superfície carregada negativamente e então, uma camada de contra-íons (camada fixa) é formada próxima à parede do capilar para que seja mantida a eletroneutralidade. A concentração de contra-íons decresce com a distância e, eventualmente, aproxima-se do valor da concentração dos íons na solução, formando a camada difusa. Quando um potencial é aplicado à superfície, forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa, causando a movimentação dos íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo um fluxo de solução como um todo, conhecido como EOF (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993; WEINBERGER, 2000; TAVARES, 1996; SKOOG, 2008). Porém, em condições de pH baixo (2,5-4,0) a ionização é baixa e o EOF não é significativo (TAVARES, 1996). O EOF é responsável pelo movimento de espécies não carregadas através do capilar quando é aplicado o campo elétrico (WEINBERGER, 2000). Sendo assim,

a migração de um analito está relacionada à mobilidade eletroforética e à mobilidade eletroosmótica, oriunda do EOF.

I.1.3 TIPOS DE INJEÇÃO

Em CE, há duas maneiras de introduzir a amostra na capilar: injeção hidrodinâmica e injeção eletrocinética.

I.1.3.1 Injeção hidrodinâmica

A injeção hidrodinâmica é a técnica de injeção mais difundida em CE. Neste caso, a amostra é introduzida no capilar pela aplicação de pressão nas extremidades do mesmo (*inlet* e *outlet*). Desta forma, pressão positiva pode ser aplicada na extremidade onde se aplica a amostra (normalmente *inlet*) ou pressão negativa pode ser aplicada na outra extremidade (*outlet*). Este tipo de injeção é não-seletiva, uma vez que não há discriminação dos componentes da amostra no momento da injeção, sendo a injeção uma amostra representativa do conteúdo original da mesma (KUBAN et al. 2013).

A injeção hidrodinâmica é regida pela lei de Poiseuille, onde a quantidade de amostra injetada obedece à equação I.3:

$$\text{Amostra injetada} = \frac{\Delta P r^4 \pi C t}{8 \eta L}, \text{ equação I. 3}$$

onde, ΔP = diferença de pressão; r = d.i capilar; C = concentração da amostra; t = tempo de injeção; η = viscosidade da solução; L = comprimento do capilar.

O volume de amostra introduzido no capilar é sempre constante, a menos que a viscosidade da solução da amostra sofra alterações. O fator limitante deste tipo de injeção é que apenas 1-3% do volume total do capilar é preenchido com solução de amostra, uma vez que volume maior pode acarretar dispersão da amostra devido a diferenças na velocidade do EOF na região da amostra e do eletrólito de corrida (BREADMORE, 2009).

I.1.3.2 Injeção eletrocinética

A injeção eletrocinética (EKI, do inglês, *electrokinetic injection*) utiliza o princípio da eletroforese para injetar a amostra no capilar, ou seja, os analitos que possuem carga migram para o capilar por uma combinação da própria mobilidade eletroforética e do EOF, enquanto o meio e os outros componentes da amostra que não possuem carga migram apenas pelo EOF (BREADMORE, 2009).

A **Figura I.3** mostra a diferença entre as injeções hidrodinâmica e eletrocinética em uma mesma amostra.

Figura I.3. Simulação de injeções hidrodinâmica (A) e eletrocinética (B) de uma mistura de cátions e ânions em condições sem EOF. Capilar de 50 cm de comprimento total, 25 cm até o detector, com tensão aplicada de 25 kV. A injeção hidrodinâmica ocupa 1% do capilar. A injeção eletrocinética foi feita a 10 kV por 12 s (volume do meio de amostra de 1%). Solução de eletrólitos: 20 mM Tris-HEPES. A amostra contém 1 μ M de cada analito em 0,2 mM Tris-HEPES (adaptado de BREADMORE, 2009).

Na EKI, a quantidade de amostra injetada (equação I.4) é função da mobilidade eletroforética do analito, da mobilidade eletrosmótica e da condutividade da amostra (WEINBERGER, 2000; KUBAN, et al., 2013).

$$\text{Amostra injetada} = \frac{(\mu_e + \mu_{eo})\pi r^2 V t}{L} \quad \text{C, equação I.4 (ROSE; JORGESON, 1988);}$$

onde, μ_e = mobilidade eletroforética; μ_{eo} = mobilidade eletrosmótica e V = tensão aplicada.

Íons com mobilidade maior entram no capilar mais rapidamente que íons com mobilidade menor, sendo um aspecto positivo para análises de íons com alta mobilidade, uma vez que será possível obter baixo valor de limite de detecção, mas será desvantajoso para a análise de íons com menor mobilidade eletroforética. Assim, neste tipo de injeção, a alíquota da amostra injetada não corresponde exatamente à composição original da mesma. Além disso, outra desvantagem é que qualquer variação na composição da matriz da amostra provoca uma resposta diferente, consequentemente há diminuição na reprodutibilidade do método (BREADMORE, 2009).

I.1.4 TÉCNICAS DE *STACKING*

O desenvolvimento de estratégias/técnicas para concentrar a banda da amostra inserida no capilar, sem que haja perda na resolução, tem sido bastante estudado. Essas técnicas envolvem a manipulação da composição da amostra (através da manipulação da velocidade eletroforética do analito) e do eletrólito de corrida associada aos procedimentos de injeção, sem que haja modificação da instrumentação (de MORAES et al., 2009).

A maioria das técnicas de *stacking* é baseada em mudanças na velocidade de migração do analito na solução em que a amostra foi preparada e na solução de eletrólitos da corrida eletroforética. Essa mudança na velocidade de migração é causada por uma mudança no campo elétrico entre as duas zonas de contato (região da amostra e região do eletrólito de corrida) ou por uma mudança na carga efetiva do analito, que promove o empilhamento (*stacking*) do mesmo (BONATO, 2010). Existem diferentes abordagens de *stacking* e elas incluem *field-amplified sample stacking* (FASS), *field-amplified sample injection* (FASI) e *large volume sample stacking* (LVSS), nos quais os analitos são concentrados pela diferença de força do campo elétrico induzido por uma diferença de condutividade entre a região da amostra e do eletrólito de corrida (de MORAES et al., 2009; BREADMORE et al., 2009; BONATO, 2010), chamado de *stacking* mediado por força iônica (BONATO, 2010), o que provoca o empilhamento dos analitos na região da amostra. Outras abordagens como *dynamic pH junction* dependem de mudança da velocidade do analito por mudança na ionização da amostra e tampão de corrida em pH diferentes, e isotacoforese transiente na qual os analitos são empilhados entre um eletrólito líder (mobilidade maior que qualquer componente da

amostra) e um eletrólito terminador (mobilidade menor que a de qualquer componente da amostra) (de MORAES, et al., 2009; BONATO, 2010).

I.1.4.1 *Field amplified sample stacking* - FASS

A FASS é a forma mais simples de *stacking* e é baseada na diferença de condutividade entre a zona de injeção da amostra e do eletrólito de corrida. Neste caso, a amostra é dissolvida em um meio mais diluído que o eletrólito de corrida. Sendo assim, a intensidade do campo elétrico formado é maior na região onde este encontrar maior resistividade (região de menor concentração do eletrólito) de forma que a mobilidade do analito carregado será maior nessa região. Quando o analito atinge a zona do eletrólito de corrida (maior concentração de íons e, portanto, menor resistividade), sua mobilidade é reduzida, provocando o empilhamento do analito nos segundos iniciais da separação. Em seguida, o campo elétrico se torna homogêneo e a amostra é separada normalmente por CZE (do inglês, *capillary zone electrophoresis*). Esta técnica permite o aumento da detectabilidade de 10 a 100 vezes (de MORAES, et al., 2009; SIMPSON, et al., 2008). Entretanto está limitada a uma injeção de amostra que corresponde a apenas 5% do volume do capilar (BREADMORE, 2009).

I.1.4.2 *Field amplified sample injection* – FASI

Assim como no FASS, neste tipo de *stacking* analito está dissolvida em um meio de baixa condutividade. Entretanto, em FASI é utilizada a injeção eletrocinética, enquanto que em FASS a amostra é injetada hidrodinamicamente. Esse meio de baixa condutividade proporciona aumento na quantidade de analito que é introduzido no capilar, devido ao aumento da velocidade dos íons (PERLATTI, et al. 2013). Além disso, um *plug* de baixa condutividade - água, por exemplo – pode ser introduzido no capilar antes da injeção eletrocinética (BURGI; CHIEN, 1991; de MORAES, et al., 2009; BONATO, 2010, PERLATTI, et al. 2013). Quando a tensão é aplicada, o campo elétrico na região dos analitos é aumentado, fazendo com que os mesmos se concentrem rapidamente entre a zona do *plug* de água e do eletrólito de corrida. Como a velocidade eletroforética dos analitos é muito maior que o EOF, apenas uma pequena porção do meio no qual o analito está contido é introduzido no capilar, caso seus componentes não possuam carga. Com essa técnica é

possível obter fatores de concentração de até 1000 vezes (BONATO, 2010), sendo esta técnica combinada com diversos tipos de extração *offline* para análise de diversos fármacos em material biológico.

I.1.5 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA

O estudo de fármacos comercializados na forma de racemato é bastante importante a fim de avaliar as propriedades cinéticas e dinâmicas estereosseletivas e ainda verificar se existem vantagens na produção do enantiômero puro (AGRANAT, 2010). Além disso, a presença de um ou mais centros quirais em uma molécula leva à formação de enantiômeros, que muitas vezes apresentam propriedades farmacológicas e biológicas diferentes (FANALI, 2000; CASLAVSKA; THORMANN, 2011).

I.1.5.1 Compostos quirais

O conceito básico de resolução quiral teve início em 1809, com o cristalógrafo Hauy, mas foi Pasteur, em 1848, que efetivamente descobriu a diferença de atividade entre dois enantiômeros, ao publicar que a enzima *Penicillium glaucum* consome mais rapidamente o enantiômero (+)-tartarato de amônio do que o (-)-tartarato de amônio.

Pasteur também foi responsável pela primeira resolução de enantiômeros. Após observar que os cristais do racemato de tartarato de amônio e sódio possuíam duas formas enantiomórficas distintas, ele os separou manualmente, com o auxílio de uma pinça e uma lente de aumento, e demonstrou que os dois tipos diferentes de cristais rotacionavam a luz polarizada em sentidos opostos. Este experimento de Pasteur é conhecido como o marco da resolução quiral (LOURENÇO et al., 2010).

As moléculas que não se sobrepõem às próprias imagens especulares, originando duas formas enantioméricas são chamadas moléculas quirais (**Figura I.4**). Para que uma molécula seja considerada quiral, ela deve possuir pelo menos um centro de quiralidade assimétrico. São exemplos de centros quirais: C, Si, S, N e P.

Figura 1.4. Desenho esquemático de uma molécula quiral com carbono assimétrico (McMURRY, 2012).

Moléculas quirais apresentam enantiomeria e as moléculas que apresentam mais de um centro de quiralidade apresentam diastereoisomeria. Os diastereoisômeros são estereoisômeros que não são imagens especulares um do outro. Os diastereoisômeros quirais possuem configurações opostas em um ou mais centros de quiralidade, mas apresentam a mesma configuração no restante da molécula. Enquanto os enantiômeros possuem configuração oposta em todos os centros de quiralidade (KEVIN, 1894; McMURRY, 2012). Vale ressaltar que os enantiômeros possuem as mesmas características físicas, como solubilidade ou ponto de fusão, e os diastereoisômeros podem apresentar diferentes propriedades físicas e químicas.

Embora possuam a mesma estrutura química, os enantiômeros podem apresentar diferenças na atividade farmacológica, toxicológica, farmacocinética e no metabolismo (CASLAVSKA; THORMANN, 2011). Essas diferenças se devem pela natureza quiral dos aminoácidos, peptídeos, proteínas e polissacarídeos que compoem o sítio de ligação fármaco-receptor, uma vez que esses sítios sensíveis a estereoquímica irão interagir de forma distinta com cada enantiômero, levando a respostas de atividade diferentes.

Devido a essas diferenças, os órgãos regulatórios, como FDA (*Food and Drug Administration*), passaram a exigir dos fabricantes a identificação e caracterização individual de cada enantiômero na mistura racêmica do novo produto (BONATO et al., 2005).

Para atender a essas exigências, diversas técnicas de separação e quantificação enantiosseletiva em matrizes biológicas e ensaios analíticos foram desenvolvidas. A CE é uma técnica que tem sido bastante importante na análise quiral, uma vez que possui alta eficiência, baixo custo e possibilidade de grande variedade de seletores quirais (FANALI, 2000).

1.1.5.2 Separação Enantiosseletiva em CE

A resolução enantiomérica é de grande importância nas áreas farmacêuticas, farmacológicas, agroquímicas, ambiental, biomédica e forense.

As separações enantioméricas em CE são baseadas em interações diferenciadas entre os analitos e o(s) selector(es) ou ainda em diferenças de migração entre os complexos formados. Assim, o complexo de migração e o comportamento da migração do soluto complexado e livre são fenômenos a serem avaliados em CE quiral (DUBSKY et al., 2010; CHANKVETADZE, 2009).

Atualmente a maioria das separações enantioméricas por CE é realizada adicionando seletos quirais ao eletrólito de corrida (VESPALEC, 2010), resultando na formação de diastereoisômeros transitórios. A diferença de estabilidade nas interações dos enantiômeros com o seletor quiral ocasiona diferentes mobilidades tempo-dependentes resultando na separação dos enantiômeros (BONATO et al., 2005).

Um bom seletor quiral deve apresentar as seguintes características: ser estereosseletivo e formar complexo diastereoisomérico com cada enantiômero; apresentar rápida cinética de complexação; ser solúvel e quimicamente estável no eletrólito de corrida; não interferir na detecção (BLANCO; VALVERDE, 2003). A resolução entre os enantiômeros é alcançada quando ocorre diferença na constante de complexação entre o analito e o seletor quiral e ainda quando há diferença na mobilidade entre os complexos formados (WEINBERGER, 2000; GÜBITZ, SCHMID, 2008).

Diversas substâncias podem ser utilizadas como seletos quirais em CE, como éteres coroa, antibióticos macrocíclicos, proteínas, polissacarídeos, surfactantes quirais, sendo as ciclodextrinas (CDs) os seletos quirais mais utilizados em CE.

1.1.5.2.1 Ciclodextrinas

Uma das maiores aplicações das CDs, como ferramenta analítica, é a sua utilização na resolução de compostos quirais. A versatilidade dentro da química analítica está relacionada às suas estruturas singulares e ao fato de que as CDs mantêm o seu reconhecimento analítico e as propriedades de encapsulamento sujeitas às condições experimentais como pH,

polaridade da molécula, força iônica e temperatura (ARMSTRONG, 1988; BLANCO; VALVERDE, 2003).

As CDs são oligossacarídeos quirais cíclicos obtidos da degradação do amido e possuem o formato de um cone truncado com uma cavidade interna relativamente hidrofóbica e, devido à presença de grupos hidroxila nas bordas da cavidade, essas moléculas possuem também uma região hidrofílica. As CDs nativas α , β e γ acontecem naturalmente e são compostas por seis, sete ou oito unidades de anidroglicopirranose, respectivamente (**Figura I.5**). Os grupos hidroxil presentes nas posições 2, 3, e 6 estão disponíveis para derivatização. Uma grande variedade de CDs nativas e derivatizadas estão disponíveis comercialmente (ARMSTRONG, 1988; GÜBITZ; SCHMID, 2008). As CDs derivatizadas possuem alto poder de resolução e diferentes características químicas, podendo melhorar a capacidade de reconhecimento quiral e a solubilidade. Além disso, as CDs podem ser classificadas em neutras, aniônicas, catiônicas e anfóteras (ARMSTRONG, 1988; DE OLIVEIRA, 2011).

Figura I.5. Diferenças estruturais entre as CDs nativas α , β e γ .

Uma das principais características das CDs é a formação de complexos de inclusão reversíveis com compostos que se encaixam dentro da cavidade e são menos polares do que a água. Esses complexos formados podem ter mobilidades diferentes, atingindo o detector em tempos diferentes. Não há um mecanismo geral de reconhecimento, embora a resolução enantiomérica dependa das condições de reação e do microambiente químico da entrada na cavidade da CD. No processo de reconhecimento quiral, os enantiômeros entram, pelo menos parcialmente, na cavidade das moléculas de CD formando complexos diastereoisoméricos transitórios. Desta forma, os enantiômeros devem apresentar diferenças de complexação com o seletor quiral (SCRIBA, 1991; CHANKVETADZE, 2009, DODZIUK et al., 2004; LOURENÇO et al., 2010) e consequentemente mobilidades diferentes (equação I.5) (SCRIBA, 1991; WREN, ROWE, 1992; CHANKVETADZE, 2009).

$$\Delta\mu = \mu_R - \mu_S = \frac{\mu_f + \mu_{cR}K_R[C]}{1 + K_R[C]} - \frac{\mu_f + \mu_{cS}K_S[C]}{1 + K_S[C]}, \quad \text{equação I.5}$$

onde μ_R = mobilidade apresentada pelo enantiômero (R), μ_S = mobilidades apresentadas pelo enantiômeros (S); μ_f = mobilidade dos enantiômeros na forma livre, não

complexados; K_R e K_S = constantes de equilíbrio do complexo entre os enantiômeros (R), (S) e o seletor quiral, respectivamente; μ_{cR} e μ_{cS} = mobilidades dos complexos diastereoisoméricos temporários formados entre seletor quiral e o enantiômeros; e $[C]$ = concentração do seletor quiral.

Considerando que a mobilidade dos enantiômeros complexados não difere significativamente ($\mu_{cR} = \mu_{cS} = \mu_c$), a diferença nas constantes de inclusão ($K_R \neq K_S$) entre os enantiômeros e as CDs é responsável pela enantioresolução (equação I.6), pois os diastereoisômeros formados terão mobilidades diferentes (SCRIBA, 1991; WREN, ROWE, 1992; DE OLIVEIRA, 2011).

$$\Delta\mu = \mu_R - \mu_S = \frac{(\mu_f - \mu_c)(K_S - K_R)[C]}{1 + [(K_R + K_S)[C] + K_R K_S [C]^2]}, \quad \text{equação I.6.}$$

A separação enantiomérica também pode ser realizada de acordo com a diferença entre as mobilidades dos complexos ($\mu_{cR} \neq \mu_{cS}$) (equação I.7), quando as constantes de complexação forem consideradas iguais ($K_R = K_S = K$).

$$\Delta\mu = \mu_R - \mu_S = \frac{K[C](\mu_{cR} - \mu_{cS})}{1 + K[C]}, \quad \text{equação I.7.} \quad \text{(SCRIBA, 1991; WREN, ROWE, 1992;)}$$

De forma geral, o mecanismo de separação quiral por CE pode ser baseado na enantiosseletividade refletida nas constantes de complexação, nas mobilidades dos complexos diastereoméricos, ou em ambos simultaneamente (JUVANCZ et al., 2008; CHANKVETADZE, 2009).

I.2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo mostrar a versatilidade da eletroforese capilar para análise aquiral de formas farmacêuticas sólidas, e quiral na análise enantiosseletiva da ligação do nebivolol às proteínas plasmáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRANAT, I.; WAINSCHEIN, S. R. The Strategy of enantiomers patent drugs. **Drug Discovery Today**, v.15 (5), pp. 163-170, 2010.

ARMSTRONG, D. W. Cyclodextrins in analytical chemistry. *Advances in inclusion science*. v. 5, pp. 437-449, 1988.

ASENSI-BERNARDI, L.; MARTIN-BIOSCA, Y.; MEDINA-HERNANDEZ, M. J.; SAGRADO, S. On the zopiclone enantioselective binding to human albumin and plasma proteins. An electrokinetic chromatography approach. **J Chromatogr A**, v. 1218, pp. 3111-3117, 2011-a.

ASENSI-BERNARDI, L.; MARTIN-BIOSCA, Y.; VILLANUEVA-CAMAN, R. M.; MEDINA-HERNANDEZ, M. J.; VIVES, S. S. Evaluation of enantioselective binding of fluoxetine to human serum albumin by ultrafiltration and CE – Experimental design and quality considerations. **Electrophoresis**, v. 31, pp. 3268–3280, 2011-b.

BLANCO, M., VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**. Vol. 22, p. 428–439, 2003.

BONATO, P. S. Técnicas de Pré-Concentração Online em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 2 (4), pp. 69-76, 2010.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M.. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Quim.Nova**, v. 28(4), pp. 683-691, 2005.

BREADMORE, M. C. Electrokinetic and hydrodynamic injection: making the right choice for capillary electrophoresis. **Bioanalysis**. v.1 (5), pp. 889-894, 2009.

BURGI, D. S.; CHIEN, R. L. Optimization in sample stacking for high-performance capillary electrophoresis. **Anal. Chem.**, v. 63 (18), pp 2042–204, 1991.

CASLAVSKA, J.; THORMANN, W. Stereoselective determination of drugs and metabolites in body fluids, tissues and microsomal preparations by capillary electrophoresis (2000–2010). **J Chromatogr A**, v. 1218, pp. 588–601, 2011.

CHANKVETADZE, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, 2009.

DE MORAES, M. L. L.; DE MORAES, S. L.; PEREIRA, E. A.; TAVARES, M. F. M. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE) Parte 1 Manipulação da velocidade eletroforética do analito. **Quim Nova**, v. 32 (4), pp. 1041-1046, 2009.

DE OLIVEIRA, A.R.M. Análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos empregando eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**. Vol. 3, p. 231-247, 2011.

DODZIUK, H.; KOZMINSKI, W.; EJCHART, A. NMR studies of chiral recognition by cyclodextrins. **Chirality**, v. 16, pp. 90-105, 2004.

DUBSKY, P.; SVOBODOVA, J.; TESAROVA, E.; GAS, B. Enhanced selectivity in CZE multi-chiral selector enantioseparation systems: Proposed separation mechanism. **Electrophoresis**, v. 31, pp. 1435–1441, 2010.

FANALI, S. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. **J Chromatogr A**. Vol. 875, p.89-122, 2000.

FRANÇOIS, Y.; ZHANG, K.; VARENNE, A.; GAREIL, P. New integrated measurement protocol using capillary electrophoresis instrumentation for the determination of viscosity, conductivity and absorbance of ionic liquid–molecular solvent mixtures. **Analytica Chimica Acta**, v. 562 (2), pp. 164-170, 2006.

GÜBITZ, G.; SCHMID, M. Chiral separation by capillary electromigration techniques. **J Chromatogr A**, v. 1204 (2), p. 140 – 156, 2008.

HANSEN, S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. **Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis**. Capillary Electrophoresis. pp. 211–229, 2011.

HJERTÉN, S. Free zone electrophoresis. **Chromatogr Rev.** v. 9(2), pp.122–219, 1967.

KEVIN, W.T.L. The molecular tactic of a crystal. Clarendon Press.

KNOX, J.H. Terminology and nomenclature in capillary electroseparation systems. **J. Chrom. A**. v. 3, p. 680, 1994.

KUBAN, P.; SEIMAN, A.; KALJURAND, M. Sampling and Quantitative analysis in capillary electrophoresis. IN: GARCIA, C. D.; CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; CARRILHO, E (Eds.). Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis: Principles, applications and limitations. Estados Unidos: Wiley, 2013, 41-62.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. (Ed.) Capillary electrophoresis: principles and practice. Berlin: Springer-Verlag, 1993. 371 p.

LIN, C.-E.; DENG, Y.-JR.; LIAO, W.-S.; SUN, S.-W., LIN, W.-Y., CHEN, C.-C. Electrophoretic behavior and pK_a determination of quinolones with a piperazinyl substituent by capillary zone electrophoresis. **J Chromatogr**. v. 1051, pp. 283-290, 2004.

LOURENCO, T. C.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Quím.Nova**. v. 33(10), 2010.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, M. A.; ESCUDER-GILABERT, L.; VILLANUEVA-CAMAÑAS, R. M.; SAGRADO, S.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M. J. Evaluation of enantioselective of propanocaine to human serum albumin by ultrafiltration and electrokinetic chromatography under intermediate precision conditions. **J Chromatogr B**, v. 889-890, pp. 87-94, 2012.

PASCALI, J. P.; BORTOLOTTI, F.; TAGLIARO, F. Recent advances in the application of CE to forensic sciences, an update over years 2009–2011. **Electrophoresis**, v. 33, pp. 117–126, 2012.

PERLATTI, B.; CARRILHO, E.; AGUIAR, F. A. Sample stacking: a versatile approach for analyte enrichment in CE and Microchip-CE. IN: GARCIA, C. D.; CHUMBIMUNITORRES, K. Y.; CARRILHO, E (Eds.). Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis: Principles, applications and limitations. Estados Unidos: Wiley, 2013, 23-37.

PROKHOROVA, A.; SHAPOVALOVA, E. N.; SHPIGUN, O. A. Chiral analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis using antibiotics as chiral selectors. **J Pharm Biomed Anal**, v. 53 (5), pp. 1170-1179, 2010.

QUIRINO, J. P.; TERABE, S. Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 902 (1), pp. 119-135, 2000.

RAMAKRISHNA, N. V.; VISHWOTTAM; K. N.; KOTESHWARA, M.; MANOJ, S.; SANTOSH, M.; VARMA, D. P. Rapid quantification of nebivololol in human plasma by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 39 (5), pp. 1006-1013, 2005.

ROSE, D. J.; JORGENSEN, J.W. Characterization and automation of sample introduction methods for capillary zone electrophoresis. **Anal. Chem.** v. 60, p. 642, 1988.

SCRIBA, G.K.E. Cyclodextrins in capillary electrophoresis enantioseparations – Recent developments and applications. **Journal of Separation Science**. v. 19, p. 1991, 2008.

SIMPSON, S. L.; QUIRINO, J. P.; TERABE, S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. *Fundamentals and applications. Journal of Chromatography A*. v. 1184, pp. 504–541, 2008.

SKOOG, D. A. Eletroforese Capilar e Eletrocromatografia. **Princípios da análise fundamental**. 8ª Ed. Porto Alegre, Bookman, 2008. Cap. 30, pp. 946-963.

TAGLIARO, F.; MANETTO, G.; CRIVELLENTI, F.; SCARCELLA, D.; MARINGO, M. Hair analysis for abused drugs by capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking. **Forensic Science International**. v. 92, pp. 201-211, 1998.

TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, pp. 363-373, 2000.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Quím Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

VESPALEC, R. Y. Principles of chiral separations by free-solution electrophoresis, in: Van Eckhaut A., Michitte Y., editors. Chiral separation by capillary electrophoresis. CRC Press; cap. 2, pp. 23-46, 2010.

WEINBERGER, R., Capillary Zone Electrophoresis, in: Weinberger, R., Practical Capillary Electrophoresis, 2nd Edn, Chap. 2, pp. 25–72, Academic Press, New York, 2000.

WREN, S.A.C; ROWE, R.C. Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis. 1. Initial evaluation of a model. **Journal of Chromatography**.v. 603, p. 269, 1992.

ZHANG, H.; QI, L.; MAO, L.; CHEN, Y. Chiral separation using capillary electromigration techniques based on ligand exchange principle. **J Sep Sci.**, v. 35(10-11), pp. 1236-1248, 2012.

CAPÍTULO II

**ANÁLISE DE COMPRIMIDOS DE NEBIVOLOL
POR CE**

II.1 INTRODUÇÃO

Em 2008, foi introduzido no mercado brasileiro o nebivolol (**FiguraII.1**) (ANVISA, 2008), um fármaco β -bloqueador de 3ª geração. O nebivolol é um bloqueador β_1 -adrenérgico altamente seletivo e que possui propriedades vasodilatadoras. O nebivolol aumenta a biodisponibilidade da óxido nítrico sintase via óxido nítrico L-arginina, levando à vasodilatação e à diminuição da resistência vascular periférica, além da inibição dos receptores α_1 -adrenérgicos e supressão da renina (MÜNZEL; GORI, 2009).

FiguraII.1. Estrutura química do nebivolol (*Centros quirais) (CHEYMOL, 1997).

O nebivolol é um fármaco com caráter básico ($pK_a=8,22$) e é altamente lipofílico ($\log P = 3,21$ – coeficiente de partição octanol/água), além de sofrer extenso metabolismo hepático, sendo a enzima CYP2D6, da família do citocromo P450 (CYP 450), a principal responsável por sua metabolização, que induz a formação de diversos metabólitos ativos, principalmente hidroxilados ou conjugados do ácido glicurônico (PRISANT, 2008).

Alguns métodos são descritos na literatura para a quantificação do nebivolol por cromatografia líquida de alta eficiência em formas farmacêuticas (GOWDA et al., 2009; KACHHADIA; DOSHI; JOSHI, 2008) e em plasma (NANDANIA et al., 2013; SELVAN et al., 2007; RAMAKRISHNA et al., 2005). Também são descritos alguns estudos de estabilidade do nebivolol em diferentes formas farmacêuticas (SHAH et al., 2008; DANGI et al., 2010) por HPLC. Contudo, não foram encontrados estudos para análise do nebivolol por CE disponíveis em bancos de dados eletrônicos.

Associados ao desenvolvimento de métodos é importante que os mesmos sejam validados, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados e a reprodutibilidade do método (ANVISA, 2003). Existem guias oficiais que podem ser seguidos para se realizar a validação analítica, como por exemplo os guias da ANVISA, da USP – *United States Pharmacopeia*, e

do ICH – *International Conference on Harmonization.*

II.2 OBJETIVOS

II.2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método por CE para a análise de formas farmacêuticas sólidas (comprimidos) de nebivolol

II.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as condições para análise do nebivolol por CE;
- Desenvolver e validar um método para análise do nebivolol em comprimidos por CE;
- Aplicar o método para análise de comprimidos de nebivolol.

II.3 MATERIAL E MÉTODOS

II.3.1 EQUIPAMENTOS

Os constituintes das soluções tampão, bem como padrão analítico e CDs foram pesados em balança analítica Sartorius, modelo CPA225D (Goettingen, Alemanha). Um peagômetro, modelo PHS-3B da PHTEK (São Paulo, Brasil), foi empregado para medir o pH das soluções tampão. Para a desgaseificação das soluções empregadas em CE, foi utilizado um sistema de ultrassom Ultrasonic Cleaner modelo 03350 (Diadema, Brasil). Foi utilizado um *mixer* Phoenix modelo AP56, (Araraquara, SP, Brasil) para homogeneização das soluções. O banho maria utilizado nos ensaios de estabilidade para avaliar a seletividade foi Water bath modelo 1102 (Fanem, Guarulhos, Brasil). O sistema de purificação de água, Milli-Q PLUS - Millipore/Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA) forneceu água livre de resíduos orgânicos e inorgânicos para o preparo das soluções aquosas.

As análises foram realizadas em um sistema de Eletroforese Capilar Beckman Coulter (Beckman, CA, EUA) modelo P/ACE™ MDQ com amostrador automático e equipado com um detector *diode-array* (DAD), acoplado a um sistema de aquisição de dados e *software* 32 Karat. Foram utilizados capilares de sílica fundida da MicroSolv Technology (Eatontown, NJ, EUA), não revestidos, de 50 µm de diâmetro interno (d.i) e 38 cm de comprimento efetivo (c. ef.).

II.3.2 REAGENTES E SOLVENTES

Todos os reagentes e solventes necessários para a realização do estudo foram de grau analítico ou grau HPLC. O nebivolol (pureza $\geq 98\%$) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e os comprimidos de nebivolol, na dose de 5 mg, foram adquiridos no comércio local. O metanol (MeOH) foi obtido da JT Baker (New Jersey, EUA) e a acetonitrila (ACN) da Merck (Darmstadt, Alemanha). O acetato de sódio, o tetraborato de sódio e o tris-(hidroximetil)-aminometano foram obtidos da JT Baker (New Jersey, EUA) e o ácido acético foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). O fosfato de sódio monohidratado, da Synth (Diadema, Brasil), o citrato de sódio da Fisher (Waltham, EUA). O ácido acético foi obtido da Labsynth (São Paulo, Brasil) e o hidróxido de sódio foi adquirido da Nuclear (São

Paulo, Brasil). As soluções utilizadas no equipamento de CE foram filtradas em filtros Millex – HA com poro de 45 µm, obtidos da Millipore (Bredford, EUA) e levadas ao ultrassom para eliminação de bolhas dissolvidas no meio.

II.3.3 CAPILAR

Antes do primeiro uso o capilar de sílica foi condicionado por lavagem com solução de NaOH 1,0 M por 30 min e, em seguida, com água por 30 min, a 25°C. No início de cada dia de trabalho, o capilar foi lavado com solução de NaOH 0,1 M por 15 min e seguido por lavagem com água por 15 min. Entre as análises o capilar foi lavado com NaOH 0,1 M por 1 min, seguido de água ultrapura por 1,0 min e eletrólito de corrida por 1,5 min. Esse procedimento é importante e necessário para proporcionar repetibilidade às análises. Após o uso diário, o capilar foi lavado com solução de NaOH 0,1 M por 15,0 min e depois com água ultrapura por 15,0 min. O capilar foi armazenado em água quando não estava em uso.

II.3.4 SOLUÇÕES PADRÃO

A solução estoque (1000 µg/mL) e as soluções de trabalho (10, 25, 50, 75 e 100 µg/mL) do nebivolol foram preparadas em metanol e armazenadas a -20 °C e protegidas da luz.

II.3.5 ANÁLISE DO NEBIVOL POR CE

Cinquenta microlitros da solução-padrão de nebivolol na concentração de 50 µg/mL, foram transferidos para o *vial* da amostra no qual foram adicionados 100 µL de H₂O ultrapura. Para a análise do nebivolol foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Eletrólito de corrida: tetraborato de sódio, fosfato de sódio monoidratado, acetato de sódio, tris-(hidroximetil)-aminometano e citrato de sódio, variando o valor de pH e a concentração molar.

- Condições de análise: temperatura (15, 20 e 25 °C) e tensão aplicada (15, 20 e 25 kV).

Para estas análises foi realizada a injeção hidrodinâmica utilizando 1,0 psi de pressão por 10 segundos.

II.3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CE

Segundo a ANVISA (2003), a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito. Para este estudo, foram consideradas as recomendações do Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA que consta no Anexo da Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.

II.3.6.1 Conformidade do sistema

O teste de conformidade do sistema, *system suitability*, é um teste que assegura que todo o sistema selecionado para o desenvolvimento do processo de análise esteja apto a fornecer resultados com precisão e exatidão.

Esse teste foi realizado no início de cada dia de validação, sendo feitas cinco injeções de solução padrão de mesma concentração (50 µg/mL) e o tempo de migração, assimetria, número de pratos, altura e resolução foram determinados.

II.3.6.2 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003).

A fim de avaliar se as condições analíticas definidas são capazes de separar o neбиволol de possíveis produtos de degradação formado, soluções padrão de neбиволol (100 µg/mL) foram submetidas à hidrólise ácida, básica, neutra e oxidativa, de acordo com o guia ICH (2003).

Para avaliar a hidrólise, 1,0 mL da solução padrão de neбиволol na concentração de 100 µg/mL foi distribuída em dois balões volumétricos de 2,0 mL, sendo adicionada de 1,0 mL de HCl 0,1 M para hidrólise ácida, 1,0 mL de NaOH 0,1 M para hidrólise básica e 1,0 mL

de água ultrapura para hidrólise neutra. Após 120 min em banho-maria a 80 °C, as soluções foram neutralizadas com 0,1 M de NaOH ou HCl.

Para a oxidação química, foi adicionado 1,0 mL de peróxido de hidrogênio a 3% em balão volumétrico de 2,0 mL contendo 1,0 mL de solução padrão 100 µg/mL. Em seguida, essa solução foi incubada em banho-maria por 120 min a 80 °C.

O ensaio foi realizado em triplicata e as amostras analisadas por CE nas condições previamente estabelecidas.

II.3.6.3 Linearidade

Linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada. Sendo assim, a linearidade foi determinada pela análise do nebivolol em cinco níveis de concentração, 10, 25, 50, 75 e 100 µg/mL, em triplicata.

O gráfico de linearidade foi construído colocando no eixo das abscissas (x) as concentrações e no eixo das ordenadas (y) a área equivalente dos picos obtidos em cada eletroferograma. Os dados foram então submetidos à análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados para calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r).

Além disso, a adequação deste modelo foi avaliada pela análise de variância ANOVA *lack of fit*, calculando os valores de *F* e *p*, para um nível de confiança de 95%. Os cálculos estatísticos foram realizados empregando o programa MINITAB *Release* versão 14.1.

II.3.6.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando os parâmetros da curva analítica (equação II.1).

O LD foi calculado pela razão entre o desvio padrão e a inclinação da curva de calibração analítica, multiplicado por 3 (equação II.2). Enquanto o LQ foi calculado pela razão entre o desvio padrão e a inclinação da curva de calibração analítica, multiplicado por 10 (equação II.3).

$$y = ax + b, \quad \text{equação II. 1;}$$

$$LD = \frac{a}{b} \times 3, \quad \text{equação II.2;}$$

$$LQ = \frac{a}{b} \times 10, \quad \text{equação II.3;}$$

onde a = desvio padrão da curva analítica, b = inclinação da curva analítica.

II.3.6.5 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram determinadas por estudos intra e interdia.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003). A precisão intradia foi calculada a fim de determinar a concordância entre os resultados das medições sucessivas no mesmo dia. Para isso, foram feitas análises das amostras em triplicata, em três níveis de concentração do nebivolol (10, 50 e 100 µg/mL), no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. A precisão interdia foi avaliada pela realização das análises em dois dias consecutivos, nos mesmos níveis de concentração descritos anteriormente.

Os resultados obtidos foram expressos como coeficiente de variação (CV%), de acordo com a equação II.4.

$$CV\% = \frac{s}{\bar{X}} \times 100, \quad \text{equação II.4;}$$

onde s = desvio padrão absoluto, $\bar{X}$ = média dos resultados obtidos.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e uma referência aceita como verdadeira. Também foram feitas análises das amostras em triplicata em três diferentes níveis de concentração do nebivolol (10, 50 e 100 µg/mL). Assim, a exatidão foi calculada pela razão entre a diferença da concentração média determinada experimentalmente (valor obtido) e a concentração teórica (valor real) correspondente, sendo expressa pelo erro relativo (E%), de acordo com a equação II.5 (USP, 2013).

$$E\% = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \times 100, \quad \text{equação II.5.}$$

II.3.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE COMPRIMIDOS DE NEBIVOLOL

II.3.7.1 Preparo das amostras de comprimidos de nebivolol

Dez comprimidos de nebivolol, com teor declarado de 5 mg, foram precisamente pesados, triturados e a massa equivalente a 5 mg de nebivolol foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Foi adicionado metanol e a mistura foi levada ao ultrassom por 10 min, deixada em repouso por 10 min e em seguida o volume foi completado com metanol. Uma alíquota de 1,0 mL foi transferida para um outro balão volumétrico de 10 mL e então o volume foi completado com metanol. Esta solução, de 50 µg/mL, foi analisada por CE. O teor encontrado de nebivolol foi calculado baseado em uma curva de calibração analítica.

II.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.4.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS PARA ANÁLISE DO NEBIVOLOL

II.4.1.1 Eletrólito de corrida

O nebivolol é um fármaco com caráter básico ($pK_a = 8,22$). Uma estratégia para análise deste tipo de composto é a utilização de solução tampão com capacidade tamponante em meio ácido, uma vez que em baixos valores de pH a adsorção dos analitos catiônicos e a carga da superfície do capilar podem ser diminuídas (FANALI, 2000). A escolha correta da solução de eletrólitos é muito importante, pois ela deve apresentar a capacidade de manter o pH constante durante toda a análise, uma vez que o EOF e a mobilidade eletroforética são sensíveis à variação de pH (WEINBERGER, 2000). Além disso, a solução de eletrólitos deve possuir baixo valor de absorbância no comprimento de onda selecionado para a análise e baixa mobilidade, a fim de minimizar a geração de calor por efeito Joule (TAVARES, 1997).

Assim, foi avaliada a influência de diferentes soluções de eletrólito sobre o tempo de migração do nebivolol, em capilar de 38 cm c.ef. e 50 μm d.i., temperatura de 20°C e tensão de 30 kV, e os resultados estão descritos na **Tabela II.1**.

Tabela II.1. Influência da composição da solução de eletrólitos sobre o tempo de migração do nebivolol.

Solução de eletrólitos	Concentração molar (mM)	pH	Tempo de migração (min)
Acetato de sódio	50	4	6,6
Fosfato monobásico de sódio	50	4	19,5
Citrato de sódio	50	4	17,2
Tetraborato de sódio	50	4	-
		9	-
Tris	50	4	-
		9	-

(-) Não houve migração até 50 minutos.

Dentre os eletrólitos avaliados, apenas três promoveram a migração do nebivolol no tempo avaliado (50 minutos). Em pH elevado, utilizando a solução tampão tetraborato de sódio e tris como eletrólitos de corrida, apesar do alto valor de EOF, também não houve migração, pois neste valor de pH o nebivolol migra em sentido contrário ao EOF. Sendo assim, foi escolhido para as análises seguintes o tampão acetato de sódio que, dentre os eletrólitos avaliados, foi o que apresentou o menor tempo de migração do nebivolol.

II.4.1.2 Avaliação do pH

Em separações eletroforéticas, o pH do eletrólito de corrida é um parâmetro muito importante, pois ele determina a ionização dos analitos de interesse e controla o EOF, garantindo assim reprodutibilidade do método (WEINBERGER, 2000). O pKa do nebivolol é 8,22, dessa forma, em condições de pH inferior a 8,22 esta molécula se encontra ionizada. Assim, foram avaliados os valores de pH 4, 5 e 6 pois nestes valores de pH o nebivolol está completamente ionizado, apresentando carga positiva. Além disso, o pH é importante para garantir o tamponamento da solução de eletrólitos. O acetato de sódio possui pKa = 4,76, sendo a sua faixa de tamponamento entre os pHs 3,76 e 5,76.

Os resultados da influência do pH sobre o tempo de migração e a eficiência estão descritos na **Tabela II.2**.

Tabela II.2. Influência do pH sobre o tempo de migração e eficiência do nebivolol.

pH	Tempo (min)	Número de Pratos (N)
	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão
4	6,6 ± 0,06	28167 ± 752,75
5	6,3 ± 0,23	27237 ± 631,21
6	6,1 ± 0,12	25875 ± 617,43

Em pH 6, a média do tempo de migração do nebivolol foi de 6,1 min, sendo menor ($p < 0,05$) do que em pH 4 e 5 ($t = 6,6$ min e $t = 6,3$ min, respectivamente), uma vez que o EOF, neste valor de pH, é maior. Entretanto, a fim de garantir o tamponamento da solução de eletrólitos e a completa ionização do analito durante a corrida eletroforética, optou-se por utilizar pH 4 para as análises seguintes, apesar do tempo de corrida ter sido um pouco maior. Além disso, a eficiência do pico foi maior ($p < 0,05$) neste valor de pH.

II.4.1.3 Avaliação da concentração do tampão

A escolha da concentração do tampão para as separações eletroforéticas deve considerar dois efeitos:

- Altas concentrações podem comprometer a eficiência de separação, devido a formação de um gradiente de temperatura que é fracamente dissipado (efeito Joule);
- Baixas concentrações podem aumentar a tendência de adsorção de certos solutos na parede do capilar, podendo vir a ocorrer alargamento e distorção das bandas eletroforéticas (TAVARES, 1997).

A concentração da solução do tampão acetato de sódio foi avaliada na faixa de 10 – 100 mM, temperatura de 20°C e tensão de 30 kV, em triplicata. Os resultados deste estudo estão apresentados **Figura II.2**.

Figura II.2. Influência da concentração da solução tampão sobre o tempo de migração do neбиволol (n=3, $p<0,05$).

Pode ser observado que, à medida que a concentração da solução tampão aumentou houve um aumento no tempo de migração ($p<0,05$). Estes dados podem ser explicados pelo aumento da viscosidade do meio, que proporciona uma redução na mobilidade dos analitos (MORANTE-ZARCERO, 2004 , FAKHARI, 2008), além de haver uma diminuição do EOF, devido à compressão da dupla camada elétrica (WEINBERGER, 2000).

Outro evento observado foi a diminuição da eficiência do método com o aumento da concentração dos eletrólitos, sendo a maior eficiência visualizada com 25 mM (27711) e a

menor com 100 mM (15725), efeito que se deve provavelmente a formação de um gradiente de temperatura. Levando em consideração um menor tempo de migração e uma maior eficiência, foi selecionada a concentração de 25 mM.

II.4.1.4 Avaliação da temperatura

A temperatura do capilar é um outro parâmetro importante a ser controlado, visto que afeta proporcionalmente a mobilidade dos analitos (FANALI et al., 2000). Dessa forma, foi avaliada a influência da variação da temperatura de 15 a 30 °C, sobre o tempo de migração do analito e os resultados estão mostrados na **Figura II.3**.

Figura II.3. Influência da temperatura de análise sobre o tempo de migração do neбиволол (n=3, p<0,05).

Os resultados mostram que, à medida que a temperatura aumenta, há uma redução no tempo de migração. Isto pode ser explicado devido a redução na viscosidade do meio (WEINBERGER, 2000). Além disso, o aumento da temperatura promoveu aumento da eficiência, passando de 17032 pratos em 15 °C para 27711 em 30 °C. Sendo assim, optou-se pela temperatura 30 °C, devido ao menor tempo de análise e maior eficiência.

II.4.1.5 Avaliação da tensão aplicada

A influência da tensão aplicada sobre o tempo de migração foi estudada na faixa de 15 - 30 kV e os resultados estão apresentados na **Figura II.4**. Foi observada uma redução

significativa no tempo de migração com o aumento da tensão ($p < 0,05$), sendo a tensão de 30 kV a que proporcionou o menor tempo de corrida.

Figura II.4. Influência da tensão aplicada sobre o tempo de migração do neбиволol ($n=3$, $p < 0,05$).

Altos valores de tensão proporcionam menores tempos de migração, uma vez que a velocidade de migração eletroforética e a velocidade do EOF são diretamente proporcionais ao campo elétrico. Em elevados valores de tensão pode ocorrer efeito Joule, que é a geração de calor ocasionada pela corrente elétrica, devido à colisão entre os íons e as moléculas da solução. Caso não ocorra uma eficiente dissipação deste calor, pode ocorrer a formação de um gradiente de temperatura, provocando variações no tempo de migração, e em alguns casos perda de resolução (WEINBERGER, 2000). Outro fator decisivo para a escolha da tensão a ser aplicada é o efeito da mesma sobre a eficiência. Altos valores de tensão podem acarretar redução na eficiência (WEINBERGER, 2000). Entretanto, não foi observada redução da eficiência, mesmo com a aplicação de 30 kV. Assim, devido ao menor tempo de corrida e melhor resolução obtida, a tensão escolhida para as demais análises foi de 30 kV.

II.4.1.6 Condições de separação otimizadas

Após a otimização de todos os parâmetros, a condição selecionada para a análise do neбиволol está descrita abaixo e representada na **Figura II. 5**.

- capilar de sílica fundida 50 μm d.i e 38 cm c.ef.;
- solução tampão acetato de sódio 25 mM;
- pH 4;

- 30 °C de temperatura;
- 30 kV de tensão;
- detecção realizada em 200 nm.

Figura II.5. Eletroferograma referente à análise do nebivolol por CE.

II.4.1.7 Avaliação da eletrólise do eletrólito de corrida

Alterações na solução de eletrólitos durante a análise devido a aplicação de altas tensões podem levar à perda de repetibilidade. Este fenômeno, chamado de eletrólise ou depleção do tampão ocorre porque, em soluções aquosas, a eletrólise da água produz prótons no ânodo e íons hidróxido no cátodo. Com o tempo, a solução no reservatório do ânodo passa a apresentar caráter ácido, enquanto a solução no cátodo passa a apresentar caráter básico. Assim, quando o campo elétrico é aplicado, estes íons migram para o eletrodo de carga oposta, de forma que os cátions são atraídos para o cátodo e os ânions são atraídos para o ânodo, gerando assim um gradiente de pH dentro do capilar (JIMIDAR, 2008), tendo impacto direto sobre a ionização do soluto e magnitude do EOF, afetando área dos picos, tempo de migração, resolução e eficiência (de GAITANI et al., 2012). Sendo assim, deve-se avaliar o efeito da eletrólise sobre as análises, controlando a utilização de um eletrólito de corrida adequado e realizando sua troca entre as análises com uma determinada frequência a fim de evitar variações nos tempos de migração e resolução entre os analitos em questão (de GAITANI et al., 2012; WEINBERGER, 2000).

Para avaliar a eletrólise do eletrólito de corrida, foram realizadas 15 análises consecutivas utilizando a mesma solução contida no reservatório e calculado o coeficiente de variação (CV,%) do tempo de migração do nebivolol. Foi obtido $CV\% = 1,4$, sendo

considerado CV% $\leq$ 3,5 para utilização em várias corridas eletroforéticas (KELLY et al., 1997).

II.4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Baseado nos resultados descritos até então, prosseguiu-se com a validação analítica do método. Os parâmetros da validação do método foram realizados com as seguintes condições analíticas: capilar de sílica fundida de 50 μ m d.i. e 38 cm c.ef., eletrólito de corrida composto por tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4, temperatura de capilar de 30°C e tensão aplicada de 30 kV.

II.4.2.1 Conformidade de sistema

O teste de conformidade do sistema foi realizado antes de cada dia de validação. Como ainda não existem valores de referência para os resultados de conformidade do sistema obtidos em CE, foram utilizados como valores de referência os mesmos para HPLC (USP, 2013). Os resultados do teste de conformidade encontram-se na **Tabela II.3** e estão de acordo com o recomendado pela literatura oficial.

Tabela II.3. Teste de conformidade do sistema para a análise do neбиволол.

Parâmetro	Recomendação USP*	Dia	CV (%)	N	As
Tempo de migração (min)	CV (%) < 2	1	0,5		
		2	1,7		
		3	0,8		
Número de pratos	N > 2000	1		25251	
		2		26790	
		3		25874	
Assimetria	As < 2	1			1,40
		2			1,45
		3			1,51

*Valores de referência para análises em HPLC.

II.4.2.2 Seletividade

Após as análises da solução padrão submetida ao estudo de estabilidade, pode ser observado que o método foi seletivo, pois não houve produto de degradação ou interferente detectados no tempo de migração do padrão de nebivolol. Além disso, a pureza dos picos na solução padrão e amostras após degradação foram comparadas, apresentando valores de 99%, mostrando não haver co-migração de outro produto. As **Figuras II.6, II.7, II.8 e II.9** mostram os eletroferogramas obtidos após a degradação forçada do nebivolol em condições de hidrólise ácida, básica e neutra e ainda oxidação, respectivamente.

Figura II.6. Eletroferograma obtido após degradação forçada por hidrólise ácida do padrão analítico de nebivolol.

Quando a solução do padrão analítico de nebivolol foi exposta à hidrólise ácida, o pico eletroforético correspondente reduziu em 77%. Entretanto, não foi possível visualizar, nas condições analíticas previamente estabelecidas, a formação de picos de produto de degradação.

Figura II.7. Eletroferograma obtido após degradação forçada por hidrólise básica do padrão analítico de nebivolol.

Quando a solução do padrão analítico de nebivolol foi exposta à hidrólise básica, o pico eletroforético correspondente reduziu em 80%. Neste caso também não foi possível visualizar, nas condições analíticas previamente estabelecidas, a formação de picos de produto de degradação.

Figura II.8. Eletroferograma obtido após degradação forçada por hidrólise neutra do padrão analítico de nebivolol.

A hidrólise neutra provocou uma redução de 71% da área original do pico, sugerindo que o nebivolol está sujeito à hidrólise em água à 80°C.

Figura II.9. Eletroferograma obtido após degradação forçada por oxidação química do padrão analítico de nebivolol.

Ao ser submetido a oxidação química utilizando peróxido de hidrogênio, o pico original teve uma redução de 69% da sua área e foi observada a formação de um pico desconhecido em 2,98 min (**Figura II.9**).

O estudo de degradação forçada sob as condições descritas mostrou que o nebivolol é degradável em condições de hidrólise ácida, básica e neutra e oxidação química. Resultados semelhantes foram obtidos por SHAH et al. (2008) ao utilizar HPLC como técnica analítica, embora neste estudo tenha sido possível visualizar os picos correspondentes aos produtos de degradação.

II.4.2.3 Linearidade, LD e LQ

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância, dentro de uma determinada faixa de aplicação.

Para a análise do nebivolol, a curva de calibração analítica foi construída em cinco níveis de concentração (10, 25, 50, 75 e 100 µg/mL), em triplicata. Os resultados obtidos foram analisados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Conforme preconizado pela ANVISA, são aceitáveis para linearidade, coeficientes de correlação (r) iguais ou superiores a 0,99 e o desvio dos valores nominais não devem ser superiores a 5%.

A **Tabela II.4** apresenta a equação da reta gerada para o método proposto, além de listar os resultados da análise de variância (ANOVA) unilateral para o modelo dos mínimos