UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise enantiosseletiva da lercanidipina: controle de qualidade de
formulações farmacêuticas por eletroforese capilar e avaliação da
fotodegradação por cromatografia líquida de alta eficiência**

Luciana Pereira Lourenço

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise enantiosseletiva da lercanidipina: controle de qualidade de formulações farmacêuticas por eletroforese capilar e avaliação da fotodegradação por cromatografia líquida de alta eficiência

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

Orientado (a): Luciana Pereira Lourenço

Orientador (a): Cristiane Masetto de Gaitani

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas em 26/03/2013. A versão original encontra-se na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2013

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.

Lourenço, Luciana Pereira

Análise enantiosseletiva da lercanidipina: controle de qualidade de formulações farmacêuticas por eletroforese capilar e avaliação da fotodegradação por cromatografia líquida de alta eficiência. Ribeirão Preto, 2013.

77 p., 30 cm.

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

Orientadora: de Gaitani, Cristiane Masetto.

1. Eletroforese capilar.
2. Cromatografia líquida de alta eficiência.
3. Controle de Qualidade.
4. Estudo de fotodegradação.
5. Lercanidipina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Pereira Lourenço

Análise enantiosseletiva da lercanidipina: controle de qualidade de formulações farmacêuticas por eletroforese capilar e avaliação da fotodegradação por cromatografia líquida de alta eficiência

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: _____

DEDICATÓRIA

A Deus por toda benção que me proporcionou nesta vida.

Aos meus pais Alfredo e Sandra, que compartilham os momentos bons e difíceis da minha vida, mesmo à distância. Obrigada pelo carinho, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer todos aqueles que, de certa forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho:

A Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani, pela orientação, confiança e compreensão.

A Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato e Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, por permitir executar parte deste trabalho utilizando recursos técnicos de seu laboratório.

A Deus, que me protege, abençoa e me dá forças quando mais preciso.

Aos meus pais, Alfredo e Sandra, por sempre me incentivarem e acreditarem em minha capacidade de concluir esta etapa de minha vida.

A minha prima irmã, Sâmia, por sempre ter servido como exemplo.

Aos meus familiares, que mesmo à distância, sempre torceram por mim.

Aos amigos de laboratório, por compartilharem conhecimentos e momentos de descontração.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo auxílio prestado.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo suporte financeiro.

RESUMO

LOURENÇO, L. P. **Análise enantiosseletiva da lercanidipina: controle de qualidade de formulações farmacêuticas por eletroforese capilar e avaliação da fotodegradação por cromatografia líquida de alta eficiência.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A lercanidipina (LER) é uma dihidropiridina bloqueadora de canais de cálcio disponível comercialmente como uma mistura racêmica, ou seja, uma mistura equimolar dos enantiômeros (R)-LER e (S)-LER. Os efeitos farmacológicos da LER residem essencialmente no enantiômero (S)-LER, e estudos *in vitro* mostram que este enantiômero apresenta cerca de 100-200 vezes maior afinidade pelos canais de cálcio que o enantiômero (R)-LER. Consequentemente, os efeitos farmacodinâmicos da LER são devidos, principalmente, ao enantiômero (S)-LER. Neste sentido, fármacos racêmicos são exaustivamente estudados, para avaliar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas estereosseletivas e verificar se existem vantagens na produção do enantiômero puro. Além disso, devido às diferenças na atividade dos enantiômeros, é imprescindível realizar o controle de qualidade enantiosseletivo destas formulações. Associado a isto, as moléculas pertencentes a esta classe de fármacos são fotossensíveis. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método enantiosseletivo para análise da LER e aplicá-lo no controle de qualidade de formas farmacêuticas e também avaliar sua fotodegradação. A análise enantiosseletiva da LER e aplicação no controle de qualidade de formas sólidas foi realizado por eletroforese capilar (CE) utilizando tampão acetato de sódio 200 mmol L⁻¹, pH 4,0 como eletrólito de corrida, adicionado de TM-β-CD (2, 3, 6-O-metil-β-ciclodextrina) 10 mmol L⁻¹ como seletor quiral, na temperatura de 15 °C e 25 kV de tensão. Os parâmetros de desempenho analítico, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção, seletividade e robustez foram avaliados e estão de acordo com os requisitos preconizados pelos guias oficiais. O método foi aplicado para análise de comprimidos comerciais contendo LER, e mostrou ser adequado para quantificação das amostras, apresentando valores de coeficiente de variação (CV, %) e erro relativo (E, %) inferiores a 5 %. Além disso, foi avaliada a fotoestabilidade dos enantiômeros da LER na mistura racêmica e também dos enantiômeros separados, quando expostos à luz UVC (254 nm) e visível, por HPLC. A separação dos enantiômeros da LER foi alcançada empregando a coluna quiral Chiralpak[®] AD 250 × 4,6 mm, partículas de 10 μm e fase móvel composta por hexano-etanol-dietilamina (97:3:0,3, v/v/v) e vazão de 1,0 mL min⁻¹. O método foi validado e aplicado nos estudos de fotodegradação em soluções-padrão de LER. Em relação à exposição na luz UVC (254 nm) e visível foi observada degradação significativa dos enantiômeros da LER após 0,5 h de exposição. Além disso, os produtos de degradação foram caracterizados por LC/MS/MS e foi observada que a principal fragmentação ocorre no anel dihidropiridínico, assim como para outros fármacos desta classe, formando piridinas sem efeitos farmacológicos.

Palavras-chaves: 1. Eletroforese capilar. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Controle de Qualidade. 4. Estudo de fotodegradação. 5. Lercanidipina.

ABSTRACT

LOURENÇO, L. P. **Enantioselective analysis of lercanidipine: quality control of pharmaceutical by capillary electrophoresis and evaluation of photodegradation by high performance liquid chromatography.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Lercanidipine (LER) is a dihydropyridine calcium channel blocker commercially available as a racemic mixture, or an equimolar mixture of enantiomers (R) and LER (S)-LER. The pharmacological effects of LER essentially reside in the enantiomer (S)-LER, and in vitro studies show that this enantiomer has about 100-200 times greater affinity for calcium channels than the enantiomer (R)-LER. Consequently, the pharmacodynamic effects of LER are due mainly to the enantiomer (S)-LER. Thus, racemic drugs are extensively studied to evaluate their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties stereoselective and check if there are advantages in the production of pure enantiomer. Moreover, due to differences in the activity of the enantiomers is essential to perform quality control enantioselective these formulations. Additionally, the molecules of this class of drugs are photosensitive. The objective of this study was to develop and validate a method for enantioselective analysis of LER and apply it in the quality control of pharmaceutical forms and also evaluate their photodegradation. The enantioselective analysis of LER and application in quality control of solid forms was performed by capillary electrophoresis (CE) using sodium acetate buffer 200 mmol L⁻¹, pH 4.0 as background electrolyte, 10 mmol L⁻¹TM- β -CD (2, 3, 6-O-methyl- β -cyclodextrin) as chiral selector, at temperature of 15 °C and 25 kV voltage. The analytical parameters, linearity, precision, accuracy, limit of quantification and detection, selectivity and robustness were evaluated and accordance with the requirements recommended by official guideline. The method was applied for the analysis of commercial tablets containing LER, and proved to be suitable for quantification of the samples, with of CV (%) and E (%) less than 5%. In addition, the photostability was evaluated on the LER enantiomers and racemic mixture of the enantiomers also separated when exposed to UVC (254 nm) and visible light by HPLC. Separation of enantiomers of LER was achieved using the chiral column Chiralpak ® AD 250 $\times$ 4.6 mm, particles of 10 micrometres and a mobile phase composed of hexane-ethanol-diethylamine (97:3:0.3 v/v/v) and flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The method was validated and applied in studies of photodegradation of standard solutions of LER. The method was validated and applied in studies of photodegradation in soluções standard of LERR With relation to UVC exposure (254 nm) and visible light, significant degradation was observed after 0.5 hour exposure of the solution containing the racemic mixture and after 1 h of exposure the solution containing the isolated enantiomers of LER. Also, the degradation products were characterized by LC/MS/MS and it was observed that the major fragmentation occurs in dihydropyridine ring, as well as other drugs of this class, forming pyridines no pharmacological effects.

Keywords: 1. Capillary electrophoresis. 2. High performance liquid chromatography. 3. Quality control. 4. Study photodegradation. 5. Lercanidipine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de um equipamento de eletroforese capilar	4
Figura 2.	(A) Modelo de distribuição de cargas na dupla camada elétrica em um capilar carregado negativamente, (B) A dependência do EOF em função do pH	7
Figura 3.	Comparação entre o fluxo pressurizado comumente utilizado em HPLC e fluxo eletrosmótico utilizado em CE.....	8
Figura 4.	(A) Estrutura da β -CD, (B) representação da molécula de CD na forma de um cone truncado	10
Figura 5.	Exemplo da formação do complexo de inclusão fármaco-CD.....	11
Figura 6.	Estrutura química da amilose e celulose empregadas como fase estacionária.....	14
Figura 7.	Estrutura química de lercanidipina.....	15
Figura 8.	Influência da concentração de CD na resolução (A) e tempo de migração (B) dos enantiômeros da LER	34
Figura 9.	Influência da concentração do tampão acetato de sódio na resolução (A) e tempo de migração (B) dos enantiômeros da LER	35
Figura 10.	Influência da temperatura na resolução (A) e tempo de migração (B) dos enantiômeros da LER. Eletrólito de corrida: tampão acetato de sódio, pH 4,0, TM- β -CD: 10 mmol L ⁻¹ , 20 kV, detecção 237 nm.....	37
Figura 11.	Eletroferograma referente à influência da temperatura nas análises dos enantiômeros da LER	38
Figura 12.	Influência da tensão na resolução (A) e tempo de migração (B) dos enantiômeros da LER	39
Figura 13.	Eletroferograma referente à influência da tensão nas análises dos enantiômeros da LER	39
Figura 14.	Eletroferograma referente às condições otimizadas para análise da LER por CE.....	40
Figura 15.	Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis e suas interações em relação a altura (A), tempo de migração (B) e resolução (C)	45
Figura 16.	Eletroferograma dos enantiômeros da LER em comprimidos comerciais.....	46

Figura 17.	Cromatograma referente aos enantiômeros da LER nas condições otimizadas.....	47
Figura 18.	Representação gráfica da robustez do método em relação à altura (A) e tempo de retenção (B).....	51
Figura 19.	Avaliação do perfil de fotodegradação da LER após exposição à luz visível. Valores estatisticamente significativos em relação ao tempo zero $p < 0,0001$, ($n = 3$).....	52
Figura 20.	Avaliação do perfil de fotodegradação da LER após exposição a luz UV (254 nm). Valores estatisticamente significativos em relação ao tempo zero $p < 0,0001$, ($n = 3$).....	53
Figura 21.	Avaliação do perfil de fotodegradação dos enantiômeros isolados da LER mediante exposição à luz UV (254 nm). Valores estatisticamente significativos em relação ao tempo zero $p < 0,0001$, ($n = 3$).....	53
Figura 22.	Estrutura química da LER com seus respectivos alvos fotossensíveis .	54
Figura 23.	Espectro de íons produto do íon de m/z 612	55
Figura 24.	Proposta de fragmentação para a LER	55
Figura 25.	a) Espectro de massas ESI+ por inserção direta do bruto reacional e b) ampliação do espectro de massas ESI+ por inserção direta.....	56
Figura 26.	Possíveis estruturas do produto de degradação fotoquímica da LER ...	57
Figura 27.	a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 da LER e b) espectro de íons produto do íon de m/z 610 referente ao produto de degradação D1	58
Figura 28.	a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 da LER e b) espectro de íons produto do íon de m/z 598 referente ao produto de degradação D2.....	58
Figura 29.	Proposta de fragmentação do produto de degradação D2	59
Figura 30.	a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 da LER e b) espectro de íons produto do íon de m/z 596 referente ao produto de degradação D3.....	60
Figura 31.	Proposta de fragmentação do produto de degradação D3	60
Figura 32.	a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 da LER e b) espectro de íons produto do íon de m/z 582 referente ao produto de degradação D4.....	61

Figura 33.	Proposta de fragmentação do produto de degradação D4.....	62
Figura 34.	a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 da LER e b) espectro de íons produto do íon de m/z 418 referente ao produto de degradação D5.....	62
Figura 35.	Proposta de fragmentação do produto de degradação D5	63
Figura 36.	a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 LER e b) espectro de íons produto do íon de m/z 425.....	63
Figura 37.	a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 da LER e b) espectro de íons produto do íon de m/z 660 referente ao produto de degradação D6.....	64
Figura 38.	Proposta de fragmentação do produto de degradação D6.....	65
Figura 39.	a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 da LER, b) espectro de íons produto do íon de m/z 646 e c) espectro de íons produto do íon de m/z 660	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Métodos indicativos de estabilidade	17
Tabela 2.	Análises experimentais para avaliar a robustez do método.....	25
Tabela 3.	Análises realizadas para determinação da robustez do método	28
Tabela 4.	Avaliação do pH na resolução dos enantiômeros da LER	36
Tabela 5.	Conformidade do sistema para as análises dos enantiômeros da LER	41
Tabela 6.	Linearidade do método para os enantiômeros da LER	42
Tabela 7.	LD e LQ para os enantiômeros da LER	42
Tabela 8.	Precisão intra e interdiado método para análise dos enantiômeros da LER	43
Tabela 9.	Exatidão intra e interdiado método para análise dos enantiômeros da LER	44
Tabela 10.	Determinação dos enantiômeros da LER em amostras de comprimidos comerciais	45
Tabela 11.	Conformidade do sistema para as análises dos enantiômeros da LER por HPLC.....	48
Tabela 12.	Linearidade do método para análise dos enantiômeros da LER por HPLC	49
Tabela 13.	LD e LQ para os enantiômeros da LER	49
Tabela 14.	Precisão intra e interdiado método para análise dos enantiômeros da LER	50
Tabela 15.	Exatidão intra e interdiado método para análise dos enantiômeros da LER	50

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	vi
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Quiralidade	2
1.2 Eletroforese Capilar	3
1.2.1 Instrumentação.....	4
1.2.1.1 Injeção	5
1.2.1.2 Detectores	5
1.2.1.3 Princípios de separação	6
1.2.1.4 Separação enantiosseletiva por CE.....	9
1.2.1.5 Ciclodextrinas	10
1.3 HPLC com fases estacionárias quirais.....	12
1.3.1 Fase estacionária derivadas de polissacarídeos	13
1.4 Lercanidipina	14
2 OBJETIVOS	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Separação dos enantiômeros da LER por CE.....	21
3.1.1 Equipamentos	21
3.1.2 Reagentes e Solventes	21
3.1.3 Capilar	22
3.1.4 Soluções padrão	22
3.1.5 Separação dos enantiômeros da LER por CE	22
3.2 Ordem de migração	22
3.3 Validação do método por CE.....	23
3.4 Aplicação do método para análise dos enantiômeros da LER em formulações comerciais por CE	25
3.4.1 Preparo das amostras de comprimidos da LER	25
3.5 Separação dos enantiômeros da LER por HPLC.....	26

3.5.1 Equipamentos	26
3.5.2 Reagentes e Solventes	26
3.5.3 Soluções-padrão	26
3.5.4 Coluna quiral	26
3.5.5 Separação dos enantiômeros da LER por HPLC.....	26
3.6 Validação do método por HPLC	27
3.7 Aplicação do método para avaliação da fotoestabilidade dos enantiômeros da LER por HPLC	28
3.7.1 Estudo de fotodegradação dos enantiômeros da LER	28
3.8 Análise da LER por LC/MS/MS	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Análise enantiosseletiva da LER por CE.....	32
4.1.1 Condicionamento do capilar	32
4.1.2 Seleção do BGE.....	32
4.1.3 Tipo e concentração de ciclodextrina	33
4.1.4 Concentração do BGE	34
4.1.5 pH	35
4.1.6 Avaliação da eletrólise do BGE.....	36
4.1.7 Temperatura.....	37
4.1.8 Tensão.....	37
4.1.9 Condições de separação otimizadas	38
4.2 Ordem de migração	39
4.3 Validação do método	39
4.3.1 Conformidade do sistema	39
4.3.2 Linearidade	40
4.3.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	41
4.3.4 Precisão.....	41
4.3.5 Exatidão	42
4.3.6 Robustez	43
4.4 Aplicação do método para análise de comprimidos de LER.....	44
4.5 Análise enantiosseletiva da LER por HPLC.....	45
4.5.1 Otimização das condições para análise da LER	45
4.5.2 Validação do método	46
4.5.2.1 Conformidade do Sistema	47

4.5.2.2 Linearidade	47
4.5.2.3 Limite de quantificação (LQ)	48
4.5.2.4 Precisão.....	48
4.5.2.5 Exatidão	49
4.5.2.6 Robustez	50
4.5.3 Aplicação do método em estudo de fotodegradação da LER	51
4.5.4 Análise da LER por LC/MS/MS	55
4.5.5 Caracterização dos produtos de degradação da LER por LC/MS/MS	57
 5 CONCLUSÃO.....	 68
 REFERÊNCIAS	 70

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Quiralidade

A partir da constatação de que diferenças isoméricas podem dar origem a diferenças na atividade biológica, o reconhecimento e a possibilidade de desenvolvimento de substâncias estereoisomericamente puras passaram a ser uma abordagem de importância para a indústria farmacêutica (FEDERSEL, 1993). A maioria dos fármacos quirais é comercializada como mistura racêmica, ou seja, misturas equimolares de dois enantiômeros. Como o sistema biológico é constituído basicamente por moléculas quirais (enzimas, receptores, transportadores), a utilização de racematos pode gerar diferenças entre um enantiômero e outro em relação às suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (SMITH, 2009).

Quando ocorrem diferenças farmacodinâmicas entre os enantiômeros, admite-se que o mecanismo de ação a nível molecular envolva uma interação altamente específica entre o ligante - uma molécula quiral - e seu sítio de ação (receptor, enzima, transportadores) - um ambiente quiral. Acredita-se que o isômero mais ativo consiga uma melhor complementaridade estérica ao receptor do que o menos ativo e, portanto, tenha uma maior eficácia farmacológica (SMITH, 2009). O resultado desta ação estereosseletiva pelos receptores proteicos é devido à ocupação preferencial de um sítio receptor por um dos enantiômeros. Como consequência direta tem-se as mais diversas respostas biológicas para os estereoisômeros (LIMA, 1997). Por outro lado, diferenças farmacocinéticas entre os enantiômeros podem ocorrer devido à influência do arranjo espacial das moléculas que fazem parte dos processos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação. Portanto, os enantiômeros podem apresentar diferenças farmacocinéticas, farmacodinâmicas e de perfil de efeitos adversos, o que teria consequências diretas sobre seu uso terapêutico (SMITH, 2009).

De uma forma geral, os compostos quirais podem apresentar três tipos de comportamento biológico: a) os enantiômeros possuem atividade biológica idêntica, tanto quali como quantitativa; b) a atividade biológica desejada é atribuída a apenas um dos enantiômeros, enquanto o outro é inativo; c) um enantiômero pode ser responsável pela principal ação terapêutica e o outro pelos efeitos secundários (LIMA, 1997).

Assim, fármacos comercializados como racematos são exaustivamente estudados, no sentido de avaliar suas propriedades cinéticas e dinâmicas estereosseletivas e verificar se existem vantagens na produção do enantiômero puro (HUTT, VALENTOVÁ 2003; AGRANAT, WEINSCHTEIN, 2010). Além disso, o desenvolvimento de métodos analíticos adequados para determinar precisamente as concentrações dos enantiômeros de um fármaco,

seja em fluidos biológicos ou em preparações farmacêuticas, é pré-requisito essencial para estabelecer os parâmetros farmacocinéticos e controlar a qualidade, respectivamente (BONATO, JABOR, de GAITANI, 2005). Atualmente, para a separação analítica de compostos quirais duas principais técnicas são empregadas, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*), e mais recentemente tem sido utilizada a Eletroforese Capilar (CE - *Capillary Electrophoresis*).

1.2 Eletroforese Capilar

A CE é uma técnica de separação que se baseia na migração diferencial de espécies iônicas ou ionizáveis quando as mesmas são submetidas a um campo elétrico (SILVA et al., 2007).

A eletroforese foi pioneiramente descrita por Tselius na década de 30 e mais tarde idealizada por Hjertén, em 1967. Os primeiros trabalhos publicados datam a década de 70, entretanto, a primeira análise desenvolvida com sucesso foi publicada por Everaerts e seus colaboradores em 1979, seguida de Jorgenson e Lukcas em 1981. A partir de então, vem sendo utilizada por um número cada vez maior de pesquisadores na área de química, bioquímica, ciência forense, laboratórios clínicos, indústrias farmacêuticas etc., demonstrando a importância e aceitação desta potente ferramenta analítica (TAVARES, 2000; GERVASIO et al., 2003). Diante disso, a CE é considerada uma técnica analítica bastante versátil, usada para a separação de uma grande variedade de analitos, por exemplo, hidrocarbonetos aromáticos, vitaminas hidro e lipossolúveis, peptídeos, aminoácidos, proteínas, íons inorgânicos, catecolaminas, fármacos, substâncias quirais e polinucleotídeos como DNA (SILVA et al., 2007).

A principal vantagem da CE em relação às outras técnicas de separação é a maior eficiência e resolução obtida em um curto tempo de análise associada à utilização de pequenos volumes de amostra (1 – 10 nL por injeção) e reagentes (10 – 100 mL por dia) (TAVARES, 2000; SILVA et al., 2007). As limitações da técnica estão relacionadas à robustez quando comparada à HPLC, e baixa detectabilidade em decorrência do reduzido caminho óptico (quando a detecção é feita por absorção no UV) fornecido pelo capilar e da pequena quantidade de amostra que pode ser injetada (BONATO, JABOR, de OLIVEIRA, 2010, TERABE, 2001).

1.2.1 Instrumentação

Além de ser uma técnica versátil, a CE requer uma instrumentação relativamente simples. Os principais componentes do equipamento de CE são uma fonte de alta tensão, 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 1) (SILVA et al., 2007).

A fonte de alta tensão é conectada, através de dois eletrodos de platina, a dois reservatórios contendo uma solução de eletrólitos conveniente (BGE – *background electrolyte*). A fonte regulável de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar, com valores de tensão e corrente de até 30 kV e 330 μ A, respectivamente (BONATO, JABOR, de GAITANI, 2005; TAVARES, 1996).

Figura 1. Esquema de um equipamento de eletroforese capilar (HARRIS, 2005)

Os capilares utilizados em CE são geralmente de sílica fundida com dimensões de 25 a 75 μ m de diâmetro interno (d.i.) e 30 a 100 cm de comprimento, revestidos por uma fina camada de poliimida que confere a flexibilidade ao mesmo. Estes são preenchidos com a solução de eletrólito e em seguida, a amostra é introduzida na extremidade frontal do capilar (usualmente ânodo), pela substituição do reservatório que contém a solução de eletrólito pelo que contém a amostra (RIGHETTI et al., 2004, ASSUNÇÃO et al., 2008). O capilar é

mantido durante as análises a uma temperatura constante através da circulação de ar ou um líquido refrigerante.

A utilização de capilares de sílica fundida proporciona algumas vantagens em relação a outros materiais utilizados: i) dissipação mais eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule), devido à sua grande área superficial interna; ii) separações de alta eficiência (>200.000 pratos) devido à alta resistência elétrica a qual permite um elevado campo elétrico (100 a 500 V/cm) (PERRETT, 2003). Além disso, este material confere aos capilares muitas propriedades interessantes, como dimensões precisas, baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica, resistência mecânica, resistência ao ataque químico e alta transmitância. O uso de capilares de sílica é também responsável por um importante fenômeno em eletroforese capilar: o fluxo eletrosmótico (EOF – *electroosmotic flow*) (WEINBERGER, 2000).

1.2.1.1 Injeção

A injeção da amostra por CE pode ser realizada de duas maneiras: injeção utilizando pressão (hidrodinâmica) e injeção eletrocinética (BONATO, JABOR, de GAITANI, 2005).

A injeção hidrodinâmica pode ser realizada aplicando-se pressão no reservatório contendo a amostra ou pela aplicação de vácuo no reservatório contendo solução de BGE, na outra extremidade do capilar. Além disso, a injeção pode ser feita por sifonagem, em que a amostra é introduzida no capilar através da diferença de altura dos reservatórios contendo amostra e BGE (WEINBERGER, 2000).

O outro modo de injeção da amostra é utilizando injeção eletrocinética, na qual há a aplicação de um potencial (5 – 15 kV) nos reservatórios contendo a amostra e BGE durante um intervalo de tempo definido; e, de acordo com a relação carga/tamanho do soluto, a amostra é introduzida no capilar (SILVA et al., 2007, MAYER, 2001).

1.2.1.2 Detectores

Uma das grandes versatilidades da CE é a possibilidade de utilização de uma ampla gama de detectores. Os mais utilizados são os detectores por absorção no UV-Vis, fluorescência, fluorescência induzida por laser e espectrometria de massas. A escolha do detector depende quase que exclusivamente das propriedades do soluto em questão e da faixa de concentração contemplada (JIMIDAR, 2008).

A detecção pode ser realizada de duas formas: em linha (*on column*) ou no final do capilar. A detecção em linha é feita enquanto o soluto ainda migra no capilar, através de uma

janela óptica obtida pela retirada da camada de poliimida que reveste o capilar externamente, como é o caso da absorção UV-Vis e fluorescência. Assim, a maior limitação desta técnica, em geral, é o limite de detecção relativamente alto, consequência do limitado volume de amostra analisado e do reduzido comprimento do caminho óptico disponível – próprio diâmetro interno do capilar (MALLAMPATI et al., 2008).

Para superar essa limitação e melhorar a detectabilidade, podem ser utilizadas diferentes estratégias como por exemplo, utilizando técnicas de pré-concentração *on line*, detectores mais sensíveis como fluorescência induzida a laser ou espectrometria de massas; ou ainda, aumentar o caminho óptico pelo uso de capilares com célula de detecção em forma de bulbo ou em forma de z. Assim, após a introdução da amostra no interior do capilar, aplicação de um campo elétrico, migração dos analitos e detecção, os dados são captados por um sistema interfaceado a um computador, responsável pela conversão do sinal analógico em digital (JIMIDAR, 2008).

1.2.1.3 Princípios de separação

Nas principais técnicas de eletromigração em capilar, os compostos são separados com base na diferença entre as mobilidades iônicas, que estão relacionadas com a razão carga/tamanho (TAVARES, 2000).

A aplicação de um potencial elétrico através do capilar causa movimentos eletroforéticos e eletrosmóticos. A mobilidade eletroforética é inerente à espécie iônica. Portanto, cátions migram em direção ao cátodo (eletrodo negativo) e ânions migram em direção ao ânodo (eletrodo positivo). Quanto maior a carga e menor o tamanho do íon, maior será a mobilidade (BONATO, JABOR, GAITANI, 2005). A mobilidade eletroforética (μE) pode ser expressa pela equação 1, onde μE é dependente da carga (q), do tamanho do analito (r = raio do íon) e da viscosidade do meio (η):

$$\mu E = \frac{q}{6 \pi \eta r} \quad (1)$$

Já o EOF é consequência da interação entre a solução de eletrólito e a parede do capilar. Quimicamente, a sílica fundida é responsável pela presença de vários tipos de grupos silanóis (SiOH), os quais, em média, apresentam um caráter ácido (TAVARES, 1996). Quando em contato com uma solução aquosa, sua superfície é hidrolisada formando grupos silanóis carregados positivamente (SiOH₂⁺), neutros (SiOH) ou carregados negativamente

(SiO^-). Em pH alto estes grupos estão dissociados (SiO^-) resultando em uma superfície carregada negativamente. Para manter a neutralidade, contra íons são atraídos para a região imediatamente adjacente, formando uma camada chamada de camada fixa (SKOOG, 2008; SOARES, 2006). Devido a um movimento térmico aleatório, alguns íons difundem, afastando-se da superfície. A concentração de contra-íons decresce com a distância da parede do capilar e, eventualmente, aproxima-se do valor da concentração dos íons na solução, sendo esta região chamada de camada difusa ou móvel como mostra a figura 2A. Quando um potencial é aplicado à superfície, forças elétricas atuam nas cargas da camada móvel, causando um movimento de 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. Sendo assim, torna-se possível o movimento de espécies não carregadas. Porém, como mostrado na figura 2B, em condições de pH baixo (3,0-4,0), a ionização dos grupos silanóis é baixa e o EOF não é significativo (GIEND, 2008).

Figura 2. (A) Modelo de distribuição de cargas na dupla camada elétrica em um capilar carregado negativamente, (B) A dependência do EOF em função do pH (QUEIROZ, JARDIM, 2005)

Além disso, as características de alta eficiência desta técnica estão relacionadas ao perfil radial da velocidade eletrosmótica, pois sendo linear o mesmo componente de velocidade é adicionado a todos os analitos, independentemente de sua posição radial no interior do capilar, como esquematizado na Figura 3. Este fator diferencia a eletroforese capilar dos métodos cromatográficos em fase líquida em coluna, que apresentam um perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo induzido por pressão (TAVARES, 1996). Assim, a CE apresenta uma velocidade uniforme dos analitos pelo capilar, resultando em menor dispersão da amostra e, conseqüentemente, maior eficiência (KUHN, HOFFSTETTER-KUHN, 1993; HARRIS, 2005).

Figura 3. Comparação entre o fluxo pressurizado comumente utilizado em HPLC e fluxo eletrosmótico utilizado em CE (JIMIDAR, 2008)

A velocidade do EOF (v_{EOF}) é proporcional ao campo elétrico aplicado (E) e dependente do pH e concentração da solução de eletrólitos, os quais influenciam o potencial zeta (ζ). Além disso, a velocidade do EOF depende da viscosidade da solução (η) e da constante dielétrica do meio (ϵ), como mostra a equação 2:

$$v_{FEO} = \frac{\epsilon \zeta E}{4\pi\eta} \quad (2)$$

A velocidade do EOF é altamente dependente do pH do eletrólito, já que o potencial zeta é governado pela ionização dos grupos silanóis. O potencial zeta é definido como a diferença de potencial desenvolvido na parede do capilar, entre as camadas fixa e móvel e é influenciado pelo pH e força iônica do meio. Quando a solução está em pH alto, ocorre o aumento na ionização dos grupos silanóis da parede do capilar, como consequência, aumenta a diferença de potencial entre as camadas fixas e móvel, resultando no aumento na velocidade do EOF (GIEND, 2008).

1.2.1.4 Separação enantiosseletiva por CE

A separação enantiomérica por CE é feita principalmente pela adição de seletores quirais no BGE, resultando na formação de diastereoisômeros transitórios. A diferença de estabilidade das interações dos enantiômeros com o seletor quiral ocasiona diferentes mobilidades tempo-dependentes resultando na separação enantiomérica (BONATO, JABOR, de GAITANI, 2005). Dentre as diferentes técnicas de eletromigração disponíveis para separação de enantiômeros por CE, basicamente três delas se destacam: Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC – *micellar electrokinetic chromatography*), Eletrocromatografia Capilar (CEC – *capillary electrochromatography*) e Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE – *free solution capillary electrophoresis*).

A MEKC é comumente utilizada para separar compostos neutros. Em geral, os compostos neutros migram no capilar por ação exclusiva do EOF, não havendo discriminação espacial e/ou temporal dos solutos na chegada ao detector. Nesta técnica, ocorre a adição de agentes tensoativos iônicos no BGE, proporcionando um sistema cromatográfico de duas fases. A partição diferenciada do analito nas duas fases é responsável pela seletividade da separação. Para que ocorra a separação enantiosseletiva, é necessário que o tensoativo seja quiral (STALCUP, 2008).

Outra forma de separar enantiômeros empregando técnicas eletroforéticas é através do uso de fases estacionárias quirais em CEC. Nesta técnica, o processo eletroforético acontece em capilares de sílica recheados com fases estacionárias quirais. Esta técnica aproveita as vantagens da CE, ou seja, reduzido consumo de solvente e alta eficiência, e da HPLC, ou seja, seletividade adicional devido ao uso de fase estacionária (BONATO, JABOR, de GAITANI, 2005).

FSCE é a técnica de separação efetuada em capilares e baseada somente nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas em eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos. Estes podem conter aditivos, como ciclodextrinas (CDs), complexantes ou ligantes, que interagem com os analitos e alteram suas mobilidades eletroforéticas (SILVA et al., 2007).

Diversas substâncias podem ser utilizadas como seletores quirais em análises enantiosseletivas por CE, tais como: CDs, éter coroa, antibióticos macrocíclicos, proteínas, polissacarídeos lineares, surfactantes quirais, entre outros. Para ser eficaz, o seletor quiral deve apresentar algumas características: i) deve ser estereosseletivo e formar um complexo diastereoisomérico com cada enantiômero; ii) deve apresentar uma rápida cinética de complexação; iii) deve ser solúvel e quimicamente estável no eletrólito de corrida e iv) não

deve interferir na detecção (BLANCO, VALVERDE, 2003). Sendo assim, a separação enantiomérica será alcançada quando houver uma diferença na constante de complexação entre o analito e o seletor quiral, e ainda, quando houver uma diferença na mobilidade entre os enantiômeros (WEIMBERGER, 2000; GUBITZ, SCHMID, 2008). Será discutido a seguir apenas o seletor quiral utilizado neste estudo, as CDs.

1.2.1.5 Ciclodextrinas

As CDs são oligossacarídeos cíclicos quirais compostos por unidades de glicoses conectadas entre si por ligações α -(1,4), preparadas por reação enzimática. Elas possuem a forma de um cone truncado com uma cavidade aberta relativamente hidrofóbica enquanto as bordas da cavidade são hidrofílicas devido à presença de grupos hidroxilas primários e secundários (Figura 4). Elas contêm entre seis a doze unidades de glicose, mas somente as que contêm 6, 7 e 8 (nomeadas α , β e γ -CD, respectivamente) unidades são usadas na separação quiral. As propriedades das três CDs nativas (α , β e γ) são bastante diferentes, tais como, tamanho da cavidade, solubilidade, massa molar, pka, etc., porém apresentam a mesma profundidade (LOFTSSON, BREWSTER, 2010).

Figura 4. (A) Estrutura da β -CD, (B) representação da molécula de CD na forma de um cone truncado

No processo de reconhecimento quiral, os enantiômeros entram, ou pelo menos uma parte dele, na cavidade da molécula de CD formando complexos diastereoisoméricos, como mostra a Figura 5. Para estabilizar este complexo de inclusão podem ocorrer interações do tipo dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio, entre os grupos hidroxila da superfície externa da CD e parte da molécula do analito que ficou fora da cavidade (FANALI, 2000).

Figura 5. Exemplo da formação do complexo de inclusão fármaco-CD

Geralmente as CDs apresentam uma boa solubilidade em BGE aquoso (com exceção da β -CD nativa), não possuem espectro de absorção UV e são facilmente disponíveis no mercado. Essas propriedades combinadas com a grande habilidade de discriminação quiral permitem que as CDs sejam os seletos quirais mais utilizadas em CE (HEYDENet al., 2005).

A fim de melhorar algumas características das CDs nativas, tais como, solubilidade, interação, seletividade, profundidade da cavidade, etc., estas têm sido modificadas. Isso é possível alterando os grupos hidroxilas nas posições 2, 3 e 6 através de reação química. A partir dessa modificação, as CDs podem apresentar características neutras, carregadas negativa (aniônica) ou positivamente (catiônica), ou ainda serem anfotéricas. Desta forma, podem interagir com diferentes tipos de analitos (MARUSZAKet al., 2004).

O princípio de separação quiral é dependente do mecanismo de complexo-inclusão, que se baseia na possibilidade do analito encaixar-se na cavidade da CD. Desta forma, faz-se necessário conhecer o tamanho e a forma do seletor bem como do analito, para que ocorra uma complexação ideal (SERVAIS, CROMMEN, FILLET, 2009). Portanto, a interação entre o seletor quiral e o par de enantiômeros leva a formação de dois complexos diastereoisoméricos transitórios. Desta forma, para que ocorra a separação quiral, os enantiômeros devem apresentar diferença de complexação com o seletor quiral e, consequentemente, mobilidades diferentes (STALCUP, 2008), de acordo com a equação 3, onde $\Delta\mu$ é a diferença de mobilidade entre os dois enantiômeros, μ_f é a mobilidade do enantiômero livre, μ_c é a mobilidade do complexo, K_1 e K_2 é a constante de complexação para cada enantiômero e CA é quantidade de seletor quiral.

$$\Delta\mu = \frac{(\mu_f - \mu_c)(K_2 - K_1)[CA]}{(1 + K_1[CA])(1 + K_2[CA])} \quad (3)$$

A concentração de CD presente na solução BGE, usada para a separação eletroforética, é fundamental para alcançar uma ótima condição experimental de separação. Assim, aumentando a concentração de CD aumenta-se a probabilidade de interações; entretanto, existe uma concentração ótima para cada resolução quiral. Aumentando-se a concentração acima da quantidade ótima há uma diminuição na resolução; e, além disso, a adição do seletor quiral pode aumentar o tempo de migração devido ao aumento do tamanho do complexo formado em relação ao enantiômero livre. A não separação dos enantiômeros pode ser causada pela escolha da CD e/ou concentração errada (SERVAIS, CROMMEN, FILLET, 2009).

Além disso, a estabilidade do complexo de inclusão formado entre o analito e a CD é influenciada pela composição do BGE, pH, solvente orgânico e temperatura. A utilização de solventes orgânicos pode afetar o processo de separação diminuindo o tempo de migração e a hidrofobicidade, além de alterar o mecanismo de reconhecimento quiral. A temperatura é outro parâmetro de suma importância na resolução quiral, pois pode afetar a cinética de complexação, uma vez que a temperatura é inversamente proporcional à separação quiral (MARUSZAK et al., 2004).

1.3 HPLC com fases estacionárias quirais

O emprego de técnicas analíticas para a resolução e quantificação de fármacos quirais é essencial para se compreender os aspectos farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos destes compostos. Assim, HPLC é uma técnica simples e muito versátil, e é uma das técnicas mais utilizadas para análise de fármacos quirais (ZHANG et al., 2005).

Uma vez que os enantiômeros apresentam propriedades físico-químicas semelhantes, a separação quiral somente é alcançada em um ambiente quiral capaz de reconhecer e diferenciar as duas moléculas. Assim, o reconhecimento quiral ocorre quando a fase estacionária quiral interage de maneira diferente com os dois enantiômeros, proporcionando sua separação (SNEYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010).

A etapa da separação quiral pode ser realizada por procedimentos diretos ou indiretos. O método indireto envolve a formação prévia de diastereoisômeros por reação do analito de configuração R ou S com um reagente enantiomericamente puro e, em seguida, a separação pode ser realizada empregando fases estacionárias não-quirais. As principais vantagens desse método são o uso de colunas convencionais de HPLC, que proporciona um maior número de pratos do que as colunas quirais, e a disponibilidade comercial dos reagentes com vários grupos funcionais para a derivação (SNEYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010). Embora esse

procedimento tenha sido bastante usado, hoje em dia seu emprego é menor. As desvantagens deste método são: maior consumo de tempo atribuído à reação de derivação, uso de reagentes opticamente puros, possibilidade de racemização do reagente durante a formação dos diastereoisômeros ou na sua estocagem e a necessidade de um tratamento químico posterior para recuperação dos enantiômeros (JARDIM et al., 2006).

No método direto, a separação dos enantiômeros ocorre devido ao emprego de aditivos na fase móvel, ou, mais frequentemente, pelo emprego de fases estacionárias quirais, que formam complexos diastereoisoméricos transitórios com os enantiômeros (THOMPSON, 2005). Assim, a separação ocorre devido à diferença de estabilidade dos complexos formados, levando a uma diferença no tempo de retenção. Apesar de ser um procedimento de custo elevado, devido ao alto preço das colunas e com mecanismo de separação quiral de difícil compreensão, é bastante utilizado, pois possui algumas vantagens: vasto número e tipos de colunas quirais disponíveis comercialmente, rapidez na análise cromatográfica e os enantiômeros podem ser recuperados com relativa facilidade (HEYDEM et al., 2005).

Nos últimos anos, houve um aumento significativo no número de fases estacionárias quirais disponíveis comercialmente permitindo a resolução de uma grande quantidade de racematos. Para isso, colunas com diferentes tipos de fases estacionárias têm sido empregadas, tais como: polissacarídeos, proteínas, antibióticos macrocíclicos, ciclodextrinas e outros (JARDIM et al., 2006). Neste item, será discutida apenas a fase que foi utilizada neste estudo, ou seja, fase estacionária derivada de polissacarídeos.

1.3.1 Fase estacionária derivadas de polissacarídeos

Os polissacarídeos, como amilose e celulose, são polímeros com atividade óptica encontrados na natureza em maior abundância. A amilose e a celulose apresentam uma estrutura helicoidal, mas *in natura* apresentam capacidade limitada de resolução quiral. Entretanto, são facilmente convertidas em uma variedade de derivados criando novos sítios de reconhecimento quiral. Nessa fase estacionária disponível comercialmente, os derivados de polissacarídeos recobrem partículas de sílica usadas comumente como suporte, como mostra a Figura 6 (JARDIM et al., 2006).

Figura 6. Estrutura química da amilose e celulose empregadas como fase estacionária

O mecanismo de interação quiral depende muito dos substituintes presentes nas moléculas desses polissacarídeos. Os principais tipos de interações que podem ocorrer entre o soluto e a fase estacionária são interações polares, como ligações de hidrogênio, interação π - π e interação dipolo-dipolo (YAMAMOTO, OKAMOTO, 2004).

As fases estacionárias derivadas de polissacarídeos podem ser empregadas em três modos de eluição: fase normal, fase reversa e polar orgânica. No modo fase normal utiliza-se fase móvel composta por hexano e álcool (usualmente, isopropanol ou etanol). O tipo de álcool pode influenciar a enantiosseletividade, o tempo de retenção, seletividade e ordem de eluição dos compostos (YAMAMOTO, OKAMOTO, 2004). Quando os analitos apresentam caráter ácido ou básico, uma adição de pequenas quantidades um ácido (TFA, ácido trifluoracético) ou base (DEA, dietilamina) é indicado, a fim de melhorar a separação e o formato dos picos (PIERRIM, 2002).

No modo fase reversa os eluentes são principalmente soluções aquosas e solventes orgânicos miscíveis, acetonitrila ou etanol. O uso de soluções tampão também pode ser considerado quando se deseja controlar o pH da fase móvel. Já o modo polar orgânico é caracterizado pelo uso de fases móveis compostas por solventes orgânicos polares puros ou misturas, tais como, acetonitrila, metanol, etanol, propanol (TACHIBANA, OHNISHI, 2001).

1.4 Lercanidipina

Os bloqueadores de canais de cálcio fazem parte de um grupo de fármacos que inibem o influxo de íons cálcio através de seus canais voltagem-dependentes localizados na membrana celular. Atualmente aprovados para uso clínico, são divididos em duas classes: fenilalquilaminas (por exemplo, verapamil) e as dihidropiridinas (DHPs, por exemplo, a lercanidipina). A classe das DHPs é a mais numerosa e incluem o maior número de novos compostos (GODFRAIND, 1987; GOODMAN et al., 1992; BUCKLEY et al., 2007).

A lercanidipina (LER), ($\pm$) 3-{1-[(3,3-diphenylpropyl)(methyl)amino]-2-methylpropan-2-yl} 5-methyl 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate, é uma diidropiridina bloqueadora dos canais de cálcio que, seguramente, reduz os altos níveis de pressão arterial, com a vantagem dos baixos efeitos adversos (NOTARBARTOLO et al, 1999; FIORI et al., 2006). A LER exerce seu efeito por promover vasodilatação decorrente do bloqueio de canais de cálcio do tipo L nas membranas celulares do músculo liso vascular. A LER, em dose única diária, exerce efeito anti-hipertensivo de longa duração, é bem tolerada e apresenta poucos efeitos adversos (BORALLI et al, 2009).

A estrutura química da LER é caracterizada pela presença de uma cadeia lateral contendo um grupo 3,3-difenilpropil-metilamina-2-metil-2-propil que foi introduzido para melhorar a duração da atividade do fármaco (Figura 7). Também, devido à presença de um éster assimétrico, a LER tem um átomo de carbono quiral na posição 4 do anel diidropiridina. Embora a maioria das DHPs apresente caráter neutro em pH fisiológico, a LER carrega uma amina com pKa de 6,8. Sendo assim, em pH 7,4, 20% da LER estará na forma ionizada (TESTA et al., 1997).

Figura 7. Estrutura química de lercanidipina. (*: centro quiral)

A LER é comercialmente disponível como uma mistura racêmica, contendo proporções iguais dos enantiômeros (R)-LER e (S)-LER. Os efeitos farmacológicos dos enantiômeros residem essencialmente no enantiômero (S)-LER, e estudos *in vitro* mostraram que este enantiômero apresenta cerca de 100-200 vezes maior afinidade pelos canais de cálcio que o enantiômero (R)-LER. Consequentemente, os efeitos farmacodinâmicos da LER são manifestados principalmente pelo enantiômero (S)-LER (CARGNONI et al., 1997; CORSINI et al., 1996; GUARNERI et al., 1997; LEONARDI et al., 1997).

A análise da LER já foi descrita na literatura utilizando HPLC (ALVAREZ-LUEJE et al., 2003; FIORI et al., 2006; PARMAR et al., 2011;SALEM et al., 2004) em fluídos biológicos e formulações. Além disso, também foi descrita a análise enantiosseletiva da LER por cromatografia com fase estacionária baseada em proteínas (DE LORENZI et al., 1997; BOATTO et al., 2003), derivados de polissacarídeos (JABOR et al., 2003 e 2004), e antibióticos macrolíticos (BOATTO et al., 2003).

Portanto, uma vez que ainda não há nenhum método citado na literatura para a análise enantiosseletiva da LER por CE e, devido ao crescente interesse em controlar a qualidade de formulações comercialmente disponíveis, há um grande interesse no desenvolvimento de novos métodos capazes de separar compostos quirais com alta resolução e eficiência, superando as vantagens dos métodos descritos na literatura. Sendo assim, um dos propósitos deste trabalho é a determinação quantitativa enantiosseletiva da LER em comprimidos comerciais a fim de controlar a qualidade do produto farmacêutico final.

Além disso, outro fator importante para avaliar a qualidade de formulações farmacêuticas, é conhecer a estabilidade do produto. A qualidade do produto farmacêutico é de fundamental importância para a segurança do paciente. A presença de impurezas e de produtos de degradação podem influenciar a eficácia e segurança do produto farmacêutico alterando suas propriedades químicas, farmacológicas e toxicológicas levando a um impacto na qualidade do produto. A estabilidade pode ser definida como a capacidade do fármaco em permanecer dentro de suas especificações estabelecidas, na qual mantém sua identidade, qualidade e pureza por um período de tempo determinado (IVANA, LJILJANA, MIRA, 2006).

Devido à simplicidade das condições de separação de diversos componentes durante as análises de estabilidade, os métodos cromatográficos tem maior aceitabilidade do que os métodos convencionais, devido principalmente à sua detectabilidade, onde pequenas quantidades de produto de degradação formado podem ser detectadas, além da sua alta capacidade de resolução. Há vários trabalhos descritos na literatura que são indicativos de estabilidade para diversos tipos de compostos, inclusive para as DHPs, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Métodos indicativos de estabilidade da LER descritos na literatura

Referência	Analito	Técnica	Matriz
Álvarez-Lueje et al., 2003	Lercanidipina	HPLC	Formulação farmacêutica
Fioriet et al., 2006	Lercanidipina	HPLC-FR LC/MS/MS	Formulação farmacêutica
Kaila et al., 2011	Lercanidipina e Atenolol	HPLC	Formulação farmacêutica
Kaila et al., 2010	Lercanidipina	HPLC	Formulação farmacêutica

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, pode-se observar que em nenhum dos trabalhos foi realizado um estudo enantiosseletivo. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar métodos para análise enantiosseletiva da LER em formulações comerciais e avaliação da estabilidade enantiosseletivada da LER.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e validação de um método para análise enantiosseletiva da LER com aplicação no controle de qualidade em formulações farmacêuticas por eletroforese capilar; avaliação do perfil de fotoestabilidade da LER por cromatografia líquida de alta eficiência e caracterização dos produtos de degradação por LC/MS/MS. Para isso, foram realizadas as seguintes etapas:

- ✓ Desenvolvimento e validação de um método para análise enantiosseletiva da LER por CE.
- ✓ Aplicação do método desenvolvido e validado em formulações farmacêuticas disponíveis comercialmente por CE.
- ✓ Desenvolvimento e validação de um método para análise enantiosseletiva da LER por HPLC.
- ✓ Aplicação do método desenvolvido e validado em estudos de fotodegradação por HPLC.
- ✓ Caracterização dos produtos de degradação formados por LC/MS/MS.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Separação dos enantiômeros da LER por CE

3.1.1 Equipamentos

As análises foram realizadas em um sistema de eletroforese capilar modelo P/ACE MDQ da Beckman Coulter (Califórnia, EUA), que consiste de um analisador, um amostrador automático e um detector de arranjo diodo operando em 237 nm. O software 32 Karat foi usado para aquisição de dados.

Os componentes empregados no preparo das soluções padrão foram pesados em balança analítica Sartorius, modelo CPA225D (Goettingen, Alemanha). O peagômetro modelo PHS-3Bda PHTEK (São Paulo, Brasil) foi empregado para medir o pH das soluções aquosas. Para eliminar os gases dissolvidos na solução, foi utilizado um sistema de ultrassom Ultrasonic Cleaner modelo 03350 (Diadema, Brasil). Foi utilizado também um agitador de tubos Phoenix modelo AP56 (Araraquara, Brasil). A água utilizada para o prepararo das soluções foi obtida do sistema Direct-Q 3 da Millipore (Massachusetts, EUA).

3.1.2 Reagentes e Solventes

Ingrediente farmacêutico ativo (API) da LER (padrão secundário), foi doado pela Medley (São Paulo, Brasil) e os comprimidos de LER (Zanidip ® 10 mg Medley) foram comprados no mercado local. Metanol (grau HPLC) foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Sulfobutil- β -CD (S- β -CD) e trimetil- β -CD (Heptakis 2,3,6-O-metil- β -CD) foram obtidos da Fluka (Buchs, Suíça) e hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD) e ácido morfolinoetanossulfônico (MES) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Acetato de sódio foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o ácido acético foi obtido da Labsynth (São Paulo, Brasil). Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) foi obtido da J.T. Baker (New Jersey, EUA). Hidróxido de sódio foi adquirido da Nuclear (São Paulo, Brasil) e ácido clorídrico foi obtido da Zilquímica (São Paulo, Brasil). Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico e do mais alto grau de pureza disponível.

As soluções usadas no equipamento de CE foram filtradas em filtro Millex – HV com poros de 0,45 μ m, obtidos da Millipore (Bedford, EUA) e levados ao ultrassom, a fim de eliminar bolhas existentes na solução.

3.1.3 Capilar

O capilar de sílica fundida de 50 μm de diâmetro interno (d.i.) foi obtido da Beckman Coulter (Califórnia, EUA). Um capilar de 60,2 cm de comprimento total e 50,0 cm de comprimento efetivo foi empregado na realização dos experimentos. O capilar de sílica fundida normalmente é recoberto por uma camada de poliimida que o torna flexível. Assim, para que a detecção ocorra *on column* é necessário remover esta camada de poliimida na região de detecção (janela óptica), e isto foi feito aquecendo uma pequena região (0,5 cm), aproximadamente 11 cm antes do final do capilar.

3.1.4 Soluções padrão

A solução estoque ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) e soluções de trabalho (25, 50, 100, 150 e $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) da LER foram preparadas em metanol. As soluções foram armazenadas a -20°C e protegidas da luz.

3.1.5 Separação dos enantiômeros da LER por CE

Vinte e cinco microlitros da solução-padrão da LER ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram transferidos para um tubo cônico âmbar e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram ressuspensos em 200 μL de uma solução contendo metanol:água (2:8, v/v) e os tubos foram agitados em *mixer* por 1 min. Esta solução foi então transferida para os *vials* de injeção e realizada a análise eletroforética.

As soluções de eletrólito foram preparadas pesando ou pipetando quantidades correspondentes dos reagentes, dissolvendo em água ultrapura e ajustando o pH requerido com ácido (solução de ácido fosfórico $1,5 \text{ mol L}^{-1}$) ou com base (solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), antes de completar o volume final.

3.2 Ordem de migração

As análises para determinar a ordem de migração dos enantiômeros da LER foram baseadas no trabalho de Jabor et al, (2003). Este trabalho foi realizado em HPLC utilizando a coluna Chiralpak[®] AD $250 \times 4,6 \text{ mm}$, partícula de $10 \mu\text{m}$ da Chiral Technologies Inc. (Exton, PA, EUA), e fase móvel composta por hexano:etanol:dietilamina (97:3:0,3, v/v/v), vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Nestas condições, foi possível coletar separadamente os picos correspondentes a cada enantiômero (S-LER e R-LER). O solvente proveniente desta coleta foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e os resíduos foram analisados nas condições em que o método analítico foi desenvolvido por CE e a ordem de migração determinada.

3.3 Validação do método por CE

A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados e possibilitando a aplicação em amostras reais (ANVISA, 2003).

Antes de iniciar a validação, o estudo de conformidade do sistema (*system suitability*) foi realizado. Os seguintes parâmetros foram avaliados durante a validação: linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e robustez, seguindo os guias oficiais (Farmacopéia Americana, 2007 e Conferência Internacional de Harmonização, 2005).

O teste de conformidade do sistema foi realizado para avaliar a segurança do equipamento, repetindo cinco injeções de uma mesma solução padrão na concentração de 100 µg mL⁻¹ da LER da mistura racêmica. Foram avaliadas as variações no tempo de migração, fator de cauda, números de pratos, altura e resolução.

A linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame (LANÇAS, 2004). Para isso, a linearidade foi determinada pela análise dos enantiômeros da LER em cinco níveis de concentração, 12,5, 25, 75 e 100 µg mL⁻¹ para cada enantiômero, em triplicata. Os gráficos da linearidade foram construídos plotando-se no eixo das abscissas as concentrações de cada enantiômero da LER e no eixo das ordenadas a altura dos picos obtidos. Os dados foram então submetidos a análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados para calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r).

O LD e o LQ foram calculados utilizando os parâmetros da curva analítica (LANÇAS, 2004). Estes foram expressos como a razão entre o desvio padrão (s) e a inclinação da curva de calibração (S) multiplicado por 3 e 10, respectivamente, de acordo com a equação 4:

$$LD = 3 \frac{s}{S} \quad LQ = 10 \frac{s}{S} \quad (4)$$

A precisão do método foi avaliada intra e interdia. 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 diferentes concentrações da LER (12,5, 50 e 100 µg mL⁻¹) no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. A precisão interdia do método foi avaliada pela realização das análises em dois dias diferentes, nas mesmas concentrações.

Para avaliação da precisão, foi construída uma curva analítica no intervalo de concentração de 12,5 – 100 µg mL⁻¹ para cada enantiômero. Os resultados obtidos foram expressos como coeficiente de variação (CV %), onde (s) é o desvio padrão absoluto e $\bar{X}$ é a média dos resultados encontrados, de acordo com a equação 5:

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \quad (5)$$

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um de referência aceito como verdadeiro (LANÇAS, 2004). Também foram feitas análises das amostras em triplicata em três diferentes concentrações da LER (12,5, 50 e 100 µg mL⁻¹) e construída uma curva analítica no intervalo de concentração de 12,5 – 100 µg mL⁻¹ para cada enantiômero. Assim, a exatidão foi expressa como a porcentagem do erro (E, %) em relação a concentração teórica correspondente, de acordo com a equação 6:

$$E\% = \frac{(\text{valor encontrado} - \text{valor real})}{(\text{valor real})} \times 100 \quad (6)$$

A robustez é a capacidade do método de permanecer inalterado por pequenas mudanças. Para isso, as análises foram realizadas em soluções padrão em condições ligeiramente alteradas a partir do método definido. O teste de robustez foi avaliado usando planejamento fatorial fracionário (2-Level 2⁴⁻²) realizado pela seleção de quatro fatores em dois níveis (alto e baixo): pH (4,0 ± 0,2), concentração da solução de eletrólito (200 mmol L⁻¹ ± 5,0 mmol L⁻¹), concentração de CD (10 mmol L⁻¹ ± 2,0 mmol L⁻¹) e tensão (25 kV ± 2,0 kV), de acordo com a Tabela 2. As respostas obtidas foram avaliadas em relação à resolução e tempo de migração e foram processadas pelo software estatístico Minitab 15 (State College, PA, EUA) para avaliar a significância dos efeitos.

Tabela 2. Análises experimentais para avaliar a robustez do método

Fatores	Nível		
	Baixo	Otimizado	Alto
pH	3,8	4	4,2
Concentração de BGE (mmol L ⁻¹)	195	200	205
Concentração de CD (mmol L ⁻¹)	8	10	12
Tensão (kV)	23	25	27

3.4 Aplicação do método para análise dos enantiômeros da LER em formulações comerciais por CE

O método desenvolvido e validado foi aplicado no controle de qualidade de comprimidos da LER disponíveis comercialmente. Para essas análises, foram utilizados os mesmos equipamentos descritos no item 3.1.1 e 3.1.3, e os mesmos reagentes e solventes descritos no item 3.1.2.

3.4.1 Preparo das amostras de comprimidos da LER

Comprimidos de Zanidip® (Medley), com um teor declarado de 10 mg de LER racêmica foram analisados. Para isso, dez comprimidos foram precisamente pesados, triturados e a massa equivalente ao peso médio dos comprimidos da LER racêmica foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL e cerca de 6 mL de metanol foram adicionados. A mistura foi sonicada por 10 min, deixada em repouso por 10 min antes de completar o volume. Uma alíquota de 1,0 mL foi transferida para outro balão volumétrico de 10 mL, e então o volume foi completado. Esta solução, que apresenta uma concentração final da mistura racêmica de 100 µg mL⁻¹ (50 µg mL⁻¹ para cada enantiômero), foi analisada por CE e a concentração calculada baseada em uma curva analítica da LER racêmica.

3.5 Separação dos enantiômeros da LER por HPLC

3.5.1 Equipamentos

As análises da LER foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu (Kioto, Japão), composto por uma bomba modelo 10-AS, um injetor Rheodyne modelo 7125 com amostrador de 20 μL e um detector por absorção no UV-vis modelo SPD 10A VP, operando em 237 nm. Para o controle de aquisição de dados foi empregado o software LC Solution da Shimadzu versão 1.22 SPI.

Também foi utilizado um agitador de tubos Phoenix modelo AP56 (Araraquara, Brasil). A água utilizada para o preparo das soluções foi obtida do sistema Direct-Q 3 da Millipore (Massachusetts, EUA).

3.5.2 Reagentes e Solventes

Os reagentes utilizados (grau cromatografia) foram: hexano obtido da Mallinckrodt Beker (EUA), 2-propanol adquirido da Fisher Chemicals (New Jersey, EUA), etanol obtido da JT Baker (New York, EUA) e a dietilamina obtida da Sigma (New York, EUA).

3.5.3 Soluções-padrão

A solução estoque da mistura racêmica da LER foi preparada em metanol, na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mistura racêmica), dissolvendo 10 mg do API em um balão volumétrico de 10 mL. As soluções de trabalho foram preparadas também em metanol nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e protegidas da luz.

3.5.4 Coluna quiral

A coluna utilizada para as análises da LER foi a Chiralpak[®] AD 250 $\times$ 4.6 mm, partículas de 10 μm da Chiral Technologies Inc. (Pensilvânia, EUA).

3.5.5 Separação dos enantiômeros da LER por HPLC

Para as análises enantiosseletivas da LER, alíquotas de 25 μL da solução padrão na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram transferidos para tubos cônicos âmbar. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 50 μL de fase móvel e 20 μL foram injetados no sistema cromatográfico. A fase móvel foi composta por

hexano:etanol:dietilamina (97:3:0,3 v/v/v). A detecção foi feita no comprimento de onda de 237 nm na vazão de 1,0 mL min⁻¹.

Essa análise foi realizada baseada no trabalho de Jabor et al., 2003, porém algumas modificações foram necessárias, como: mudança na proporção dos solventes da fase móvel, porcentagem do aditivo (DEA) e vazão. Essas alterações permitiram um melhor desempenho cromatográfico e uma melhor separação dos enantiômeros da LER.

3.6 Validação do método por HPLC

Após a otimização da separação cromatográfica, foi realizada a validação do método para análises da LER em solução-padrão. A validação do método foi realizada avaliando os principais parâmetros propostos pela Resolução n° 899 da ANVISA de 2003 e orientações da Farmacopeia Americana (USP, 2007), tais como: linearidade, precisão, exatidão, LOQ e LOD e robustez.

A conformidade do sistema foi avaliada antes de se iniciar o procedimento de validação. O teste de conformidade do sistema foi realizado a fim de determinar a adequação do equipamento. Para isso, foram realizadas cinco injeções repetidas de uma mesma solução padrão contendo 100 µg mL⁻¹ da LER (mistura racêmica) em dois dias consecutivos. Foram avaliados alguns fatores, tais como: tempo de retenção, altura, resolução, fator de cauda e número de pratos.

A linearidade do método foi avaliada pela curva analítica em seis níveis de concentração (n = 3), na faixa de 12,5, 25, 50, 75, 100 e 125 µg mL⁻¹ de cada enantiômero. Alíquotas de 25 µL equivalentes a cada concentração foram transferidas para um tubo cônico âmbar, em seguida o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e analisadas cromatograficamente. A curva analítica foi construída plotando-se a altura dos picos no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações da LER no eixo das abscissas. A equação da reta ($y = ax + b$) e o coeficiente de correlação (r) foram obtidos pela análise estatística empregando o método de regressão linear dos mínimos quadrados.

A precisão e exatidão do método foram realizadas simultaneamente, utilizando três níveis de concentração (25, 50 e 100 µg mL⁻¹) em triplicata nas mesmas condições cromatográficas. A precisão e exatidão foram avaliadas intradia (único dia) e interdia (dois dias), e os resultados obtidos foram expressos pelo CV (%) e E (%), respectivamente. Para a avaliação da precisão e exatidão, foi construída uma curva analítica no intervalo de concentração de 12,5 – 100 µg mL⁻¹ para cada enantiômero, no início de cada dia de análise.

Para avaliar a robustez do método foi utilizado um planejamento fatorial fracionário (2-Level 2^{4-2}) realizado pela seleção de três fatores em dois níveis (baixo e alto): vazão da fase móvel (0,8 e 1,2 mL min⁻¹), proporção de solvente orgânico (96 e 98 %) e proporção de DEA (0,2 e 0,4 %), em um total de 8 corridas, como apresentado na Tabela 3. As respostas obtidas foram avaliadas em relação ao tempo de retenção e resolução pelo software estatístico Minitab 15 (State College, PA, EUA).

Tabela 3. Análises realizadas para determinação da robustez do método

Número de corridas	Vazão da fase móvel (mL min ⁻¹)	Solvente orgânico (%)	Aditivo (%)
1	0,8	96	0,4
2	1,2	96	0,4
3	1,2	98	0,2
4	0,8	98	0,2
5	0,8	98	0,4
6	1,2	98	0,4
7	0,8	96	0,2
8	1,2	96	0,2

3.7 Aplicação do método para avaliação da fotoestabilidade dos enantiômeros da LER por HPLC

O método desenvolvido e validado foi aplicado em estudos de fotodegradação dos enantiômeros da LER, pela exposição de soluções de LER (em metanol) à radiação UVC no comprimento de onda de 254 nm e na luz visível. O estudo da fotodegradação da LER em solução metanólica na luz UVC foi realizado com a mistura racêmica e com os enantiômeros isolados e o estudo na luz visível, apenas com a mistura racêmica.

Os equipamentos e reagentes e solventes utilizados para essas análises foram os mesmos citados no item 3.5.1, 3.5.3 e 3.5.2, respectivamente.

3.7.1 Estudo de fotodegradação dos enantiômeros da LER

A avaliação da fotoestabilidade da LER em solução metanólica (mistura racêmica) exposta à luz visível foi realizada pela exposição de 25 µL de uma solução padrão de LER

na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, em diferentes tempos a uma distância de 5 cm da fonte de luz. Para evitar a evaporação do solvente, devido ao tempo de exposição e aquecimento pela luz, foram adicionados 300 μL de metanol em cada tubo contendo a amostra. Os tubos contendo as amostras foram expostos à luz nos tempos de 0,5; 1; 2 e 3 horas na luz visível e posteriormente, o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e os resíduos foram ressuspensos em 50 μL de fase móvel, os tubos foram agitados em *mixer* por 1 min e analisados por HPLC. Este ensaio foi realizado em triplicata para cada tempo avaliado. A concentração de cada enantiômero, após exposição à luz, foi determinada baseada em uma curva de calibração da mistura racêmica e os valores obtidos, nos diferentes tempos de irradiação, foram comparados com o tempo zero (controle).

A avaliação da fotoestabilidade da solução metanólica da LER na luz UVC (254 nm) foi realizada com a mistura racêmica e também com os enantiômeros separados. A separação dos enantiômeros foi realizada nas condições descritas no item 3.6.5 e os picos referentes ao S e R-enantiômeros foram coletados na saída do detector. Após várias coletas, o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e os resíduos de cada enantiômero foram ressuspensos em 1 mL de metanol. A concentração relativa de cada enantiômero foi determinada baseada em uma curva de calibração da mistura racêmica, na faixa de concentração de $25 - 125 \mu\text{g mL}^{-1}$, para cada enantiômero.

Para avaliar a fotodegradação da mistura racêmica, bem como dos enantiômeros isolados, 25 μL de cada uma destas soluções (S-, R-LER e mistura racêmica, nas concentrações de 114, 101 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), foram transferidos para tubos cônicos e, em cada tubo, acrescentados 300 μL de metanol. A seguir, os tubos foram expostos à luz UV (254 nm) nos tempos de 1 e 2 horas a uma distância de 5 cm da fonte de luz. Posteriormente, o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi ressuspensionado em 50 μL de fase móvel, os tubos foram agitados em *mixer* por 1 min e realizada a análise cromatográfica. Este ensaio foi realizado em triplicata para cada tempo avaliado. A concentração de cada enantiômero, após exposição à luz, foi determinada baseada em uma curva de calibração da mistura racêmica e os valores obtidos, nos diferentes tempos de irradiação, foram comparados com o tempo zero (controle).

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística Graph Pad Prism® (versão 5.0). Os valores obtidos, nos diferentes tempos de irradiação, foram comparados com o tempo zero (controle) de acordo com o teste *t* de *Student*, assumindo diferenças significantes para $p < 0,01$.

3.8 Análise da LER por LC/MS/MS

Após avaliação do perfil de fotodegradação da LER por HPLC, a solução padrão da LER na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi analisada por espectrometria de massas. As análises de LC-MS/MS foram realizadas no sistema AcquityTM UPLC acoplado ao espectrômetro de massas Xevo TQ-S com fonte de ionização por eletrospray (ESI) (Waters Corp., Milford, MA, EUA). Para a aquisição e processamento dos dados foi utilizado o software Masslynx 4.1 (Micromass, Manchester, UK). A fonte de ionização foi operada em modo positivo e os parâmetros empregados nas análises foram: tempo de *scan*: 0,5 s, gás de dessolvatação: N_2 a 300°C , gás de colisão: Argônio, $3,9 \times 10^{-3}$ mbar, temperatura da fonte de ionização: 120°C , tensão do capilar: 3,2 kV e tensão do cone: 60 V. Os espectros de *full scan* e de dissociação induzida por colisão (CID) foram obtidos por infusão direta das soluções do bruto reacional em $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1 + 0,1% ácido fórmico com uma vazão de $10 \mu\text{L}/\text{min}$.

Esta etapa foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise enantiosseletiva da LER por CE

4.1.1 Condicionamento do capilar

A sílica é o material mais comum na produção de capilares em CE. É recomendado que o capilar passe por um tratamento inicial, primeiramente com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L^{-1} , o qual irá ionizar os grupos silanóis livres além de quebrar ligações epóxidos que possam estar presentes pelo uso de soluções de alto valor de pH durante seu preparo (WEINBERGER, 2000; MAYER, 2001). Esse processo resulta na formação da dupla camada, onde ocorre a atração de cátions para a parede do capilar e para finalizar o tratamento inicial do capilar, é necessário a lavagem com água ultrapura (GIEND, 2008; WEINBERGER, 2000). Além disso, também é recomendado o pré-condicionamento entre cada corrida a fim de alcançar alta eficiência de separação além de melhor repetibilidade entre as análises; para isso é necessário o tratamento do capilar com uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, água e BGE (BONATO, GAITANI, JABOR, 2009).

Diante disso, antes da primeira utilização, o capilar foi condicionado pela lavagem com solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ por 30 min, em seguida, com água por 30 min a 25°C . No início de cada dia de trabalho, o capilar foi lavado com uma solução NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por 15 min e depois com água por 15 min. Entre as análises o capilar foi lavado com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por 1,5 min, água por 1,5 min e BGE por 2,0 min. Após o uso diário, o capilar foi lavado com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por 15 min e depois com água por 15 min. O capilar foi armazenado em água quando não estava em uso.

4.1.2 Seleção do BGE

A LER é um composto fracamente básico (BARANDA et al., 2006), e uma estratégia analítica para a enantioseparação deste tipo de composto é a análise com diferentes CD neutras (nativas ou derivadas), utilizando solução tampão ácido (JIMIDAR et al., 2008). Além disso, a escolha correta da solução de eletrólitos é muito importante porque ele deve apresentar a capacidade de manter o pH constante durante toda a análise, uma vez que a EOF e mobilidade eletroforética são sensíveis à variação de pH (WEINBERGER, 2000). Normalmente, os tampões de primeira escolha são aqueles que têm alta capacidade tamponante e baixa condutividade elétrica, resultando em baixa corrente e geração de calor.

Inicialmente, os testes realizados para a escolha do eletrólito de corrida foram feitos sem a presença de um seletor quiral, pois nesta etapa o importante é conhecer o melhor BGE para as análises da amostra em um menor tempo de migração. Desta forma, foram testados como eletrólito de corrida os tampões fosfato de sódio, tris, MES e acetato de sódio. Primeiramente, foi testado o tampão fosfato de sódio na concentração de 100 mmol L⁻¹ pH 3,0, a solução de eletrólito tris na concentração de 50 e 100 mmol L⁻¹ em pH 4,0, e MES na concentração de 50 – 200 mmol L⁻¹ em pH 4,0. Entretanto, em nenhuma destas condições avaliadas foi observada a migração do pico correspondente a LER. Assim, foi avaliado o tampão acetato de sódio na concentração de 200 mmol L⁻¹, pH 4,0, 30 kVe foi observada a migração de um pico correspondente à mistura racêmica da LER. Assim, o tampão acetato de sódio foi selecionado para as análises enantiosseletivas.

4.1.3 Tipo e concentração de ciclodextrina

As ciclodextrinas (CD) são os seletores quirais mais empregados em análise enantiosseletiva por CE. Essas moléculas possuem diversas propriedades que as tornam atraentes, tais como: baixa absorção no UV, diferentes polaridade e solubilidade e alto grau de enantiodiscriminação. O mecanismo mais provável para separação dos enantiômeros utilizando CDs envolve a inclusão do analito quiral em sua cavidade e o estabelecimento de interações secundárias com grupos hidroxilas na borda das CDs. A diferença nas constantes de inclusão entre os enantiômeros e as CDs é responsável pela enantiorresolução, pois os diastereoisômeros formados terão mobilidades diferentes (DE OLIVEIRA, 2011).

Durante a otimização do método, a escolha da CD adequada para a separação quiral foi realizada inicialmente considerando características físico-químicas, forma e o tamanho da LER bem como das CDs. Baseando-se nisso, foram avaliadas as β -CD(s) derivadas. Assim, primeiramente foram testadas a S- β -CD (CD negativa) e HP- β -CD (CD neutra) como seletores quirais, porém estas não foram capazes de separar os enantiômeros da LER. Entretanto, a enantiosseparação na linha de base foi obtida quando TM- β -CD (CD neutra) foi usada como seletor quiral, provavelmente devido a uma melhor inclusão analito-CD e/ou uma melhor interação entre os enantiômeros da LER e os grupamentos metila que esta CD possui, permitindo assim uma diferença nas constantes de complexação e, conseqüentemente, uma diferença na mobilidade de cada enantiômero. Desta forma, TM- β -CD foi escolhida para os experimentos seguintes. Para esta avaliação foi utilizada solução tampão acetato de sódio 200 mmol L⁻¹, pH 4,0.

A concentração de CD presente no eletrólito de corrida usado para a separação eletroforética é de fundamental importância para alcançar uma ótima condição experimental de separação. Como pode ser observado na Figura 8A, a resolução aumenta com o aumento da concentração de CD até 10 mmol L⁻¹ e, a partir desta concentração, a resolução diminuiu. Isto pode acontecer comumente, uma vez que a separação é dependente da concentração de CD (FANALI, 2009). Por sua vez, o tempo de migração (Figura 8B) também aumentou com o aumento na concentração de CD, pois quanto maior a concentração de CD, maior o tamanho do complexo formado, e assim, sua mobilidade fica reduzida (SERVAIS, CROMMEN, FILLET, 2010). Ainda, de acordo com Rizzi (2001), os analitos carregados diminuem sua mobilidade quando a concentração do seletor não carregado é aumentada. Assim, a concentração ótima de TM-β-CD para a separação dos enantiômeros da LER foi estabelecida em 10 mmol L⁻¹. Para essas análises foram empregadas as mesmas condições eletroforéticas mencionadas anteriormente.

Figura 8. Influência da concentração de CD na resolução (A) e tempo de migração (B) dos enantiômeros da LER. Capilar eletroforética: capilar de sílica fundida, 60,2 cm de comprimento total, 50 cm de comprimento efetivo, 50 μm; eletrólito de corrida: tampão acetato de sódio 200 mmol L⁻¹, pH 4,0, 20°C, 20 kV, detecção em 237 nm

4.1.4 Concentração do BGE

A concentração da solução de eletrólito deve ser avaliada uma vez que sua força iônica pode influenciar no aquecimento interno do capilar (efeito Joule), além de alterar a mobilidade eletroforética (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993). Assim, a fim de investigar a influência da concentração do BGE, foi avaliado o tampão acetato de sódio nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 mmol L⁻¹. Nesta etapa, as análises foram realizadas na presença do seletor quiral (TM-β-CD 10 mmol L⁻¹). Como mostra a Figura 9A, o aumento gradual na concentração do BGE levou ao aumento na resolução. Além disso, houve aumento

do tempo de migração (Figura 9B), que pode ser explicado devido ao aumento da viscosidade, que proporciona redução na mobilidade dos analitos, bem como do complexo formado (analito-CD) (MORANTE-ZARCERO, 2004, FAKHARI et al., 2008). Além disso, o aumento na concentração de BGE proporciona aumento na força iônica do meio e redução do potencial zeta na parede do capilar, ocasionando diminuição do EOF (JIMIDAR, 2008; WEINBERGER, 2000). A melhor resolução com menor tempo de migração foi obtida utilizando uma solução tampão acetato de sódio 200 mmol L⁻¹. Nessas condições, a corrente gerada no capilar foi de 80 µA. Em concentrações que excederam 200 mmol L⁻¹, foi observada elevada corrente elétrica resultando no alargamento do pico.

Figura 9. Influência da concentração do tampão acetato de sódio na resolução (A) e tempo de migração (B) dos enantiômeros da LER. Capilar eletroforética: capilar de sílica fundida, 60,2 cm de comprimento total, 50 cm de comprimento efetivo, 50 µm; eletrólito de corrida: tampão acetato de sódio 200 mmol L⁻¹, pH 4,0, TM-β-CD: 10 mmol L⁻¹, 20°C, 20 kV, detecção em 237 nm

4.1.5 pH

A escolha correta do pH do eletrólito de corrida deve ser cuidadosa a fim de alcançar boa resolução quiral entre os enantiômeros, pois pode influenciar tanto o EOF quanto o tempo de migração, além de determinar a carga do soluto e influenciar na separação quiral (RIZZI, 2001). A condição mais comumente utilizada para a separação de compostos básicos, como por exemplo a LER, é em valor de pH baixo, onde o analito estará carregado positivamente e migrará em direção ao cátodo. Nessas condições, o EOF será menor e o analito migrará devido à sua própria mobilidade eletroforética (FAKHARI et al., 2008). Esses fatores permitem maior tempo para a interação entre enantiômeros e CDs. Portanto, os testes foram feitos variando o pH de 3,0 – 5,0 utilizando 10 mmol L⁻¹ de TM-β-CD como seletor quiral e concentração de 200 mmol L⁻¹ de tampão acetato de sódio. Como pode ser observado na Tabela 4, o aumento do pH da solução de eletrólito de 3,0 para 4,0 causou aumento

significativo no número de pratos e na resolução dos enantiômeros. Por outro lado, um aumento no pH de 4,0 – 5,0 ocorreu uma diminuição desses valores provavelmente devido à diminuição de cargas do analito neste valor de pH. Além disso, neste valor de pH, houve aumento no tempo de migração. Considerando que a LER é uma base fraca, com pKa de 6.8 (TESTA et al., 1997), os valores de pKa do complexo formado pode ser diferente, e assim, a carga do complexo diastereoisomérico pode ter sido modificada (SCRIBA, 2011). Assim, de acordo com os resultados obtidos, o pH 4,0 foi selecionado para as análises posteriores.

Tabela 4. Avaliação do pH na resolução dos enantiômeros da LER

pH	Tempo de Migração (min)		Número de Pratos		Resolução
	(S)-LER	(R)-LER	(S)-LER	(R)-LER	
3,0	11,44	11,57	83362	75509	0,79
4,0	11,66	11,82	215394	190436	1,31
5,0	17,33	17,52	189374	153614	1,15

4.1.6 Avaliação da eletrólise do BGE

Este processo de eletrólise, também conhecido como depleção do tampão, ocasiona uma produção de prótons no ânodo e ânions no cátodo. Com o tempo, a solução no reservatório do ânodo apresenta caráter ácido, enquanto no reservatório do cátodo a solução apresenta caráter básico. Assim, quando o campo elétrico é aplicado, estes íons migram para o eletrodo de carga oposta, ou seja, os prótons serão atraídos para o cátodo e os ânions para o ânodo, gerando como consequência, um gradiente de pH no capilar (GIEND, 2008; JIMIDAR 2008). Portanto, deve-se avaliar o efeito da eletrólise nas análises, controlando a utilização do BGE adequado e realizando sua troca entre as análises com uma determinada frequência, pois este fenômeno pode prejudicar tanto o tempo de migração quanto a resolução (WEINBERGER, 2000). Assim, para avaliar a eletrólise do BGE, foram realizadas 10 análises consecutivas utilizando a mesma solução contida no reservatório e foi determinado o coeficiente de variação do tempo de migração dos enantiômeros da LER. Kelly, Altria e Clark (1997) sugerem valores de $CV \leq 3,5 \%$ para utilização de um mesmo BGE em várias corridas. Assim, uma precisão aceitável, para o tempo de migração dos enantiômeros da LER, foi obtida após cinco corridas consecutivas usando a mesma solução de BGE.

4.1.7 Temperatura

A temperatura do capilar é um parâmetro de fundamental importância a ser controlado porque afeta proporcionalmente a mobilidade e cinética de complexação analito-CD (FANALI, 2000), devido à desorganização das moléculas (LINDNER, BÖHS, SEIDEL, 1995). A temperatura na faixa de 15-30 °C foi avaliada e foi observado que o aumento na temperatura diminuiu a separação enantiomérica e significativamente reduziu o tempo de migração (Figuras 10A e 10 B). Isto ocorreu, provavelmente, devido à diminuição da viscosidade do meio, mudanças na constante de complexação e seletividade na separação (LINDNER, 1997; AGUIAR, GAITANI, BORGES, 2011). De acordo com os resultados obtidos, a temperatura de 15 °C foi selecionada.

Figura 10. Influência da temperatura na resolução (A) e tempo de migração (B) dos enantiômeros da LER. Capilar eletroforética: capilar de sílica fundida, 60,2 cm de comprimento total, 50 cm de comprimento efetivo, 50 μ m; eletrólito de corrida: tampão acetato de sódio 200 mmol L⁻¹, pH 4,0, TM- β -CD: 10 mmol L⁻¹, 20 kV, detecção em 237 nm

4.1.8 Tensão

A influência da tensão aplicada sobre a resolução e o tempo de migração foi estudada na faixa de 10 - 30 kV. De acordo com a Figura 11A, os altos valores de tensão reduziram a resolução, provavelmente devido ao aumento excessivo da temperatura interna do capilar (efeito Joule) e ineficiência na dissipação de calor (HEURMANN, BLASCHKE, 1993). A condução da corrente elétrica através de uma solução eletrolítica gera calor através da colisão entre os íons e as moléculas da solução de eletrólitos. Esse aquecimento, conhecido como efeito Joule, pode causar a mudança na temperatura devido à dissipação ineficiente de calor e desenvolver gradientes térmicos no capilar (WEINBERGER, 2000).

A Figura 11B mostra a redução significativa do tempo de migração dos enantiômeros com o aumento gradual da tensão, pois o aumento da temperatura proporcionou a diminuição na viscosidade do meio e, consequentemente, aumentou a mobilidade dos analitos. Assim, a tensão escolhida para as demais análises foi de 25 kV e a corrente gerada foi de 52 μA .

Figura 11. Influência da tensão na resolução (A) e tempo de migração (B) dos enantiômeros da LER. Capilar eletroforética: capilar de sílica fundida, 60,2 cm de comprimento total, 50 cm de comprimento efetivo, 50 μm ; eletrólito de corrida: tampão acetato de sódio 200 mmol L^{-1} , pH 4,0, TM- β -CD: 10 mmol L^{-1} , 15°C, detecção em 237 nm

4.1.9 Condições de separação otimizadas

Após a otimização de todos os parâmetros a melhor condição para a enantioseparação da LER está descrita abaixo e representada na Figura 12.

- capilar de sílica fundida com 50 μm d.i., 50,0 cm de comprimento efetivo,
- tampão acetato de sódio 200 mmol L^{-1} ,
- pH 4,0,
- TM- β -CD 10 mmol L^{-1} ,
- 25 kV de tensão,
- 15 °C de temperatura,
- detecção em 237 nm,
- injeção hidrodinâmica (0,5 psi por 10 segundos).

Figura 12. Eletroferograma referente às condições otimizadas para análise da LER por CE. Condições eletroforéticas descritas acima

4.2 Ordem de migração

A ordem de migração foi determinada como descrita no item 3.2. Os dois picos correspondentes a S-LER e R-LER coletados usando a cromatografia líquida de alta eficiência foram analisados nas condições estabelecidas no presente trabalho e a ordem de migração foi determinada. Assim a S-LER foi o primeiro enantiômero a migrar e o seu antípoda, o segundo enantiômero a migrar.

4.3 Validação do método

A adaptação ou implementação de um método conhecido envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo costuma ser denominado de validação. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. Sendo assim, o objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (BRITO et al., 2003).

4.3.1 Conformidade do sistema

Para o bom desenvolvimento de um procedimento de validação de um determinado método analítico é preciso assegurar que todo o sistema selecionado para o desenvolvimento do processo de análise esteja apto a fornecer resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis. Esta é a etapa inicial a ser estabelecida, e é obtida para os métodos cromatográficos e eletroforéticos a partir de testes experimentais de conformidade do sistema (*system suitability*).

O teste de conformidade do sistema foi realizado antes de cada dia da validação. Foram feitas cinco injeções das soluções padrão da mesma concentração ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o tempo de migração, assimetria, números de pratos, altura e resolução foram determinados. Ainda não há valores de referência para os resultados de conformidade do sistema obtidos em CE. Assim, foram usados como valores de referência os mesmos valores utilizados para HPLC (USP, 2007) e, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, estes estão de acordo com o recomendado pela literatura.

Tabela 5. Conformidade do sistema para as análises dos enantiômeros da LER

Parâmetros	Recomendação USP	Dia	CV(%) (S-LER)	CV(%) (R-LER)	Valor Absoluto ^a (S-LER)	Valor Absoluto ^a (R-LER)
Tempo de Migração (min)	CV (%) < 2	1	0,07	0,07		
		2	0,32	0,32		
Número de Pratos	Valores > 2000	1			356.960	327.134
		2			354.674	324.078
Assimetria	Valores < 2	1			1,2	1,2
		2			1,2	1,2
Resolução	Valores > 2	1			2,0	
		2			2,0	

^aValor médio, CV (%) coeficiente de variação

4.3.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI, 2004).

Para a análise da LER, a curva analítica foi construída em cinco níveis de concentração ($12,5 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$, para cada enantiômero), em triplicata, plotando no eixo das abscissas a concentração do analito e no eixo das ordenadas a altura do pico obtido. Os resultados obtidos foram analisados pelo cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Conforme preconizado pela ANVISA, são aceitáveis para linearidade, coeficientes de correlação iguais ou superiores a 0,99 e os desvios dos valores nominais não devem ser superiores a 5% (Tabela 6).

Tabela 6. Linearidade do método para os enantiômeros da LER

	S-LER	R-LER
Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	12,5 - 100	12,5 - 100
Equação da reta	$y = 63,373x + 77,021$	$y = 56,208x + 141,89$
Coefficiente de correlação (r)	0,9980	0,9959

Curva analítica realizado em triplicata ($n = 3$) para as concentrações de 12,5, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$

4.3.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando procedimento experimental. Já o limite de quantificação representa concentração da substância em exame que pode ser medida. O método mais comumente utilizado para determinar esses valores é a relação sinal-ruído, porém ele apresenta algumas limitações em técnicas analíticas de separação (RIBANI, 2004). Assim, os valores de LOD e LOQ foram calculados baseados nos parâmetros da curva analítica (Tabela 7), que é estatisticamente mais confiável.

Tabela 7. LD e LQ para os enantiômeros da LER

Valores	S-LER	R-LER
LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,8	0,64
LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,4	1,95

4.3.4 Precisão

A precisão corresponde ao grau de concordância de resultados de testes independentes obtidos sob condições estabelecidas e é expressa pelo coeficiente de variação (CV, %). A precisão intradia foi realizada em três diferentes níveis de concentração em triplicata em um mesmo dia, enquanto a precisão interdia foi realizada também em triplicata nas mesmas concentrações, porém em dois dias diferentes. Como pode ser observado na Tabela 8, os valores de CV (%) encontrados foram inferiores a 5% para os três níveis de concentração.

Tabela 8. Precisão intra e interdia do método para análise dos enantiômeros da LER

	(S)-LER			(R)-LER		
Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	12,5	50	100	12,5	50	100
INTRADIA ($n^a = 3$)						
Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	12,4	49,8	101,1	12,4	51,2	100,1
Precisão (CV, %) ^b	3,4	4,4	3,1	4,5	3,7	3,2
INTERDIA ($n^c = 2$)						
Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	12,3	51,7	98,6	12,3	52,1	98,4
Precisão (CV, %) ^b	3,6	4,3	4,0	4,3	4,0	3,8

^a n = número de replicatas; ^b coeficiente de variação; ^c n = número de dias

4.3.5 Exatidão

A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para a mesma amostra por repetidas vezes, e pode ser representada pelo erro relativo (E, %) (PASCHOAL, 2008). Para o cálculo da exatidão, foram utilizadas as mesmas concentrações obtidas nos estudos de precisão intra e interdia. Os valores de E (%) não excederam os valores recomendados, 5%, mostrando que o método está de acordo com o preconizado para validação de método analítico (USP, 2007), como mostra a Tabela 9.

Tabela 9. Exatidão intra e interdia do método para análise dos enantiômeros da LER

Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(S)-LER			(R)-LER		
	12,5	50	100	12,5	50	100
INTRADIA ($n^a = 3$)						
Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	12,4	49,8	101,1	12,4	51,2	100,1
Exatidão (E, %) ^b	-0,8	-0,4	1,1	-0,8	2,4	0,1
INTERDIA ($n^c = 2$)						
Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	12,3	51,7	98,6	12,3	52,1	98,4
Exatidão (E, %) ^b	-1,6	3,4	-1,4	-1,6	4,2	-1,6

^a n = número de replicatas; ^b erro relativo; ^c n = número de dias.

4.3.6 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta diante de pequenas variações. Diz-se que o método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (RIBANI, 2004; PACHOAL et al., 2008).

Na determinação da robustez do método, a significância dos efeitos foi avaliada utilizando o gráfico de Pareto, onde foi empregado um planejamento fatorial composto por quatro diferentes fatores avaliados em dois níveis (baixo e alto). A Figura 13 mostra a influência de cada fator (A = tensão, B = concentração do BGE, C = pH, D = concentração de CD) na altura, tempo de migração e resolução. A linha vertical representa o valor crítico adotando $\alpha = 0,05$. Os resultados menores que o valor crítico são considerados como não significantes, enquanto os resultados maiores que o valor crítico são interpretados estatisticamente como significativos. Pode ser observado que, para a altura dos enantiômeros da LER a tensão foi um parâmetro que ultrapassou o limite aceitável, já em relação ao tempo de migração, os parâmetros tensão, concentração do tampão e pH foram relevantes. Além disso, a resolução foi alterada significativamente com a mudança na tensão, concentração do tampão e de CD. Desta forma, estes parâmetros devem ser rigorosamente controlados durante as análises dos enantiômeros da LER.

Figura 13. Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis e suas interações em relação a altura (A), tempo de migração (B) e resolução (C)

4.4 Aplicação do método para análise de comprimidos de LER

A aplicabilidade do método proposto foi avaliada para quantificação dos enantiômeros da LER em comprimidos disponíveis comercialmente (10 mg de quantidade declarada da mistura racêmica da LER), em dois dias consecutivos. Os resultados obtidos foram satisfatórios em termos de exatidão (E, %) e precisão (CV, %) (Tabela 10).

Tabela 10. Determinação dos enantiômeros da LER em amostras de comprimidos comerciais.

Amostra	S-LER	R-LER
Quantidade declarada (mg)	5	5
Quantidade encontrada ^a (mg)	5,0	5,0
CV (%)	3,3	3,0

^a números de replicatas ($n = 5$)

Os excipientes de formulação farmacêutica dos comprimidos da LER não interferiram nas análises, como pode ser observado na figura 14.

Figura 14. Eletroferograma dos enantiômeros da LER em comprimidos comerciais. Capilar eletroforética: capilar de sílica fundida, 60,2 cm de comprimento total, 50 cm de comprimento efetivo, 50 μm ; eletrólito de corrida: tampão acetato de sódio 200 mmol L^{-1} , pH 4,0, TM- β -CD: 10 mmol L^{-1} , 15°C, 20 kV, detecção em 237 nm

4.5 Análise enantiosseletiva da LER por HPLC

4.5.1 Otimização das condições para análise da LER

As análises enantiosseletivas da LER foram realizadas inicialmente baseadas no trabalho de Jabor et al., 2003. Neste trabalho foi empregada a coluna Chiralpak[®] AD 250 $\times$ 4.6 mm, partículas de 10 μm e fase móvel composta por hexano:etanol:dietilamina (95:5:0,5, v/v/v), vazão de 1,3 mL min^{-1} . Porém, na tentativa de reproduzir o método, alguns parâmetros tiveram que ser otimizados a fim de obter uma melhor separação dos enantiômeros da LER, que previamente não estava sendo alcançada.

Para otimizar as condições cromatográficas da separação enantiosseletiva da LER foram realizadas modificações no sistema de solvente citado na literatura (JABOR et al., 2003), alterando a proporção do modificador orgânico polar, o etanol. Ao longo das análises, diminuiu-se a quantidade de etanol a fim de diminuir a força cromatográfica da fase móvel e, consequentemente, ter uma maior interação dos analitos com a fase estacionária, uma vez que as análises foram realizadas no modo normal. Assim, a fase móvel utilizada para os demais experimentos foi hexano:etanol (97:3, v/v).

Além disso, foi utilizado DEA como aditivo básico, que atua como competidor com os analitos pela fase estacionária, bloqueando os grupos silanóis residuais, proporcionando um melhor perfil cromatográfico (SNAYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010). Os resultados mostraram que a diminuição de DEA na fase móvel melhorou a resolução dos picos da LER no cromatograma. Assim, 0,3 % de DEA foi a porcentagem utilizada nas análises seguintes. Também foi avaliada a vazão para a análise, sendo definida 1 mL min^{-1} como a melhor vazão para alcançar resolução adequada. A Figura 15 mostra o cromatograma referente à resolução dos enantiômeros da LER nas condições otimizadas.

Figura 15. Cromatograma referente a análise dos enantiômeros da LER. Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD, fase móvel composta por hexano:etanol:DEA (97:3:0,3 v/v/v), vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, detecção: 237 nm

4.5.2 Validação do método

Os métodos analíticos empregados na determinação quantitativa e qualitativa de fármacos e impurezas em matérias primas e formulações farmacêuticas têm papel fundamental no fornecimento de resultados confiáveis para liberação das matérias primas destinadas à produção de medicamentos e à liberação de produtos com qualidade. Portanto, para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por um processo chamado de validação. Sendo assim, para a

validação do método para análise enantiosseletiva da LER foi realizada a avaliação de alguns parâmetros da validação (RIBANI, 2004).

4.5.2.1 Conformidade do Sistema

O teste de conformidade do sistema sugere que o equipamento, com componentes eletrônicos, as operações analíticas e as amostras que serão analisadas constituem um sistema integrado, podendo avaliá-lo como tal (USP, 2007).

Para avaliar a conformidade do sistema no método enantiosseletivo da LER por HPLC, foi realizada repetidas injeções ($n = 5$) da solução-padrão da LER na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ nas mesmas condições cromatográficas e alguns fatores foram avaliados: tempo de retenção, altura, resolução, fator de cauda e números de pratos. A Tabela 11 mostra que os resultados foram satisfatórios em relação ao recomendado pela USP, 2007.

Tabela 11. Conformidade do sistema para as análises dos enantiômeros da LER por HPLC

Parâmetros	Recomendação USP	Dia	CV(%) (S-LER)	CV(%) (R-LER)	Valor Absoluto ^a (S-LER)	Valor Absoluto ^a (R-LER)
Tempo de Retenção (min)	CV (%) < 2	1	1,96	2,06		
		2	0,92	1,29		
Número de Pratos	Valores > 2000	1			2.705	2.138
		2			2.987	2.334
Fator de cauda	Valores < 2	1			1,0	1,0
		2			1,1	1,0

^a Valor médio, CV (%) coeficiente de variação

4.5.2.2 Linearidade

A linearidade é determinada pela análise de diferentes concentrações que abrange a faixa de concentração de interesse em relação à resposta das análises (CHASIN et al., 1998) com no mínimo cinco valores diferentes, em triplicata (ANVISA, 2003).

Para a determinação da linearidade, foi construída a curva analítica empregando a solução-padrão da LER nas concentrações de 12,5, 25, 50, 75, 100, 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada enantiômero. O tratamento estatístico das curvas analíticas envolveu a determinação da equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e do coeficiente de correlação (r). O valor de r permite uma estimativa da qualidade da curva analítica, estabelecendo que quanto mais próximo de 1 menor a

dispersão dos pontos na curva. Sendo assim, a ANVISA, 2003, permite um valor de r maior ou igual a 0,99. Portanto, de acordo com a Tabela 12, os resultados obtidos evidenciam linearidade satisfatória diante do que é permitido.

Tabela 12. Linearidade do método para análise dos enantiômeros da LER por HPLC.

	S-LER	R-LER
Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	12,5 - 125	12,5 - 125
Equação da reta	$y = 760,12x - 1046,5$	$y = 595,39x - 1051,9$
Coefficiente de correlação (r)	0,99	0,99

Curva analítica realizado em triplicata ($n = 3$) para as concentrações de 12,5, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$

4.5.2.3 Limite de quantificação (LQ)

O LQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão (ROZET et al., 2011). Pode ser estabelecida por meio de análises da amostra contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão (ANVISA, 2003).

Para determinar o LQ foram analisadas, em triplicata, amostras da LER na concentração de 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada enantiômero. Os resultados de precisão e exatidão estão demonstrados na Tabela 13, e estão abaixo do valor permitido pela literatura, $< 5\%$ (ANVISA, 2003).

Tabela 13. LQ para os enantiômeros da LER.

Valores	S-LER	R-LER
Concentração nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	12,5	12,5
Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	13,13	13,14
Precisão (CV, %)	0,98	0,94
Exatidão (E, %)	5,04	5,12

4.5.2.4 Precisão

A precisão em validação de métodos analíticos avalia a proximidade dos resultados obtidos entre repetidas análises efetuadas em uma mesma amostra (CHASIN, CHASIN, SALVATORI, 1994).

A avaliação da precisão do método dos enantiômeros da LER foi realizada em três níveis de concentração (baixa, média e alta), em triplicata, e foi avaliada por estudos de

precisão intra e interdia. Os resultados foram expressos pelo CV (%), e os valores obtidos ficaram abaixo de 5% (Tabela 14).

Tabela 14. Precisão intra e interdia do método para análise dos enantiômeros da LER

Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(S)-LER			(R)-LER		
	25	75	100	25	75	100
INTRADIA ($n^a = 3$)						
Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	25,2	75,3	100,8	25,4	73,2	100,8
Precisão (CV, %) ^b	2,2	1,2	1,3	1,4	0,5	0,6
INTERDIA ($n^c = 2$)						
Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	25,4	74,5	100,89	24,9	73,7	101,0
Precisão (CV, %) ^b	2,3	3,2	0,94	2,1	1,7	0,7

^a n = número de replicatas; ^b coeficiente de variação; ^c n = número de dias

4.5.2.5 Exatidão

A exatidão intra e interdia foi avaliada utilizando os dados obtidos no estudo de precisão. Os resultados da exatidão foram expressos pelos valores de E (%) e são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Exatidão intra e interdia do método para análise dos enantiômeros da LER

	(S)-LER			(R)-LER		
Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	25	75	100	25	75	100
INTRADIA ($n^a = 3$)						
Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	25,2	75,3	100,8	25,4	73,2	100,8
Erro relativo (E, %) ^b	0,8	0,4	0,8	1,6	- 2,4	0,8
INTERDIA ($n^c = 2$)						
Concentração obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	25,4	74,5	100,8	24,9	73,7	101,0
Erro relativo (E, %) ^b	1,6	- 0,6	0,8	- 0,4	- 1,7	1,0

^a n = número de replicatas; ^b erro relativo; ^c n = número de dias

4.5.2.6 Robustez

Para a avaliação da robustez do método, foi empregado um planejamento fatorial composto por três fatores e avaliados em dois níveis (baixo e alto). A importância dos resultados foi avaliada utilizando o gráfico de Pareto (Figura 16), onde A corresponde à vazão da fase móvel, B é a proporção de solvente orgânico e C representa a porcentagem de DEA. As análises foram realizadas e os resultados observados em relação à altura e tempo de retenção para cada enantiômero da LER. A linha vertical representa o valor crítico adotando $\alpha = 0,05$. De acordo com a Figura 16, pode observar que todos os fatores (A, B e C) foram significantes tanto para o parâmetro altura quanto para o tempo de retenção. Além disso, no caso do tempo de retenção, a associação desses fatores ultrapassou o limite aceitável de robustez.

Figura 16. Representação gráfica da robustez do método em relação à altura (A) e tempo de retenção (B)

4.5.3 Aplicação do método em estudo de fotodegradação da LER

A reação de fotodegradação é iniciada após absorção de uma radiação eletromagnética. A maioria das substâncias ativas empregadas na preparação de medicamentos apresenta máximo de absorção na região ultravioleta (UVC) do espectro magnético. A radiação UVC é muito energética e pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo a degradação da molécula. Desta forma, é importante conhecer a fotoestabilidade dos fármacos utilizados como medicamentos e os produtos formados devido à fotólise (SILVA, 2009).

Inicialmente, as amostras contendo a mistura racêmica da LER em solução metanólica foram expostas à luz visível no período de até 3 horas. Como pode ser observado na Figura 17, houve uma degradação significativa de ambos os enantiômeros da LER ($p < 0,01$). Em 0,5 horas de irradiação já houve degradação da LER, resultando em 78,6 % remanescente para o enantiômero S-, e 87,6 % para o enantiômero R-. Pode ser observada uma degradação gradual

conforme aumenta o tempo de exposição à luz, apresentando 49,7% e 52,7% do composto remanescente para S- e R-, respectivamente, após 3 horas de exposição.

Figura 17. Avaliação do perfil de fotodegradação da LER após exposição à luz visível. Valores estatisticamente significativos em relação ao tempo zero $p < 0,01$, ($n = 3$)

Em seguida, as soluções-padrão da LER foram expostas a irradiação UVC (254 nm) no período de 2 horas. A Figura 18 representa o perfil de degradação da mistura racêmica da LER, apresentando significância estatística ($p < 0,01$). Como pode ser observado, no período de tempo de 0,5 h já houve uma degradação significativa, resultando em 77,8% de LER remanescente para enantiômero R- e 87,3% para o enantiômero S-. Porém, a análise prosseguiu por mais tempo (2 horas) e a degradação da LER continuou, resultando em 53,4 % e 57,6 % remanescente para ambos os enantiômeros.

Figura 18. Avaliação do perfil de fotodegradação da LER após exposição a luz UV (254 nm). Valores estatisticamente significativos em relação ao tempo zero $p < 0,01$, ($n = 3$)

Além do estudo de fotodegradação da mistura racêmica, foi avaliada a fotodegradação dos enantiômeros isolados na luz UVC (254 nm) por um período de 2 horas, e o seu perfil de degradação foi estudado. Como mostra a Figura 19, na primeira hora houve uma degradação significativa ($p < 0,01$), formando 78,3 e 76,9 % remanescente de cada composto, S-LER e R-LER, respectivamente. Após 2 horas, essa degradação aumentou gradualmente, resultando em 58,1 e 65,6 % do composto remanescente, como mostra a figura 19.

Figura 19. Avaliação do perfil de fotodegradação dos enantiômeros isolados da LER após exposição à luz UV (254 nm). Valores estatisticamente significativos em relação ao tempo zero $p < 0,01$, ($n = 3$).

De acordo com a literatura, sabe-se que a classe das DHPs, da qual a LER faz parte, são moléculas que apresentam sensibilidade fotoquímica, resultando na modificação de sua estrutura. Essas alterações químicas podem levar à diminuição do efeito terapêutico além de apresentar efeitos tóxicos após a administração. De acordo com a Figura 20, sua estrutura química apresenta centros fotorreativos que resultam na clivagem da molécula quando exposta à luz UV e luz visível, tais como: grupo nitro (1), anel dihidropiridínico (2) e metilamina (3). Sendo assim, o que provavelmente ocorreu para a degradação da LER quando exposta à luz UV e luz visível, tanto na mistura racêmica quanto nos enantiômeros isolados (S-LER e R-LER), foi a oxidação do anel DHPs, levando à modificação estrutural devido à presença de grupos cromóforos nesta região. Além disso, pode ter ocorrido uma redução na região 1, hidrólise no grupo éster na posição 5 do anel e uma N-desmetilação na cadeia lateral básica (FIORI et al., 2006; BARANDA, 2004).

Figura 20. Estrutura química da LER com seus respectivos alvos fotosensíveis (adaptado de FIORI et al., 2006)

Diante dos resultados obtidos, é clara a importância de proteger amostras contendo a LER da exposição da radiação UV e luz visível, uma vez que esta demonstrou ser bastante fotosensível em um período curto de tempo (2 h). Para isso, as soluções metanólicas contendo esse tipo de fármaco devem ser adequadamente protegido da luz com o uso de recipiente de vidro colorido e estocado no escuro. Vidros de cor âmbar filtram luzes de comprimento de onda menores do que 470 nm e oferecem considerável proteção aos compostos sensíveis à luz.

4.5.4 Análise da LER por LC/MS/MS

A primeira etapa da análise da LER por LC/MS/MS foi feita pela realização de experimentos de dissociação induzida por colisão (CID) do material de partida para obtenção dos padrões de fragmentação. Desta forma o material de partida da LER foi fragmentado por colisão e o espectro de íons produto está apresentado na Figura 21.

Figura 21. Espectro de íons produto do íon de m/z 612

O espectro de íon produto apresenta o íon de m/z 280 como fragmento mais intenso. A formação deste íon foi proposta através da protonação da amina terciária seguida da eliminação de uma molécula neutra do derivado de ácido carboxílico, como apresentado na Figura 22.

Figura 22. Proposta de fragmentação para a LER

Após este estudo de fragmentação, a LER foi submetida à degradação na luz na UV (254 nm) no período de 2 horas. O bruto reacional foi analisado por espectrometria de massas com fonte de *electrospray* via inserção direta. A Figura 23 apresenta o espectro de massas obtido para esta análise, e pode ser observada uma grande diversidade de sinais, sugerindo que o procedimento de degradação foi eficiente para a LER.

Figura 23. a) Espectro de massas ESI+ por inserção direta do bruto reacional e b) ampliação do espectro de massas ESI+ por inserção direta

4.5.5 Caracterização dos produtos de degradação da LER por LC/MS/MS

A atribuição dos possíveis produtos de degradação foi realizada por estudos de fragmentação induzida por colisão e estudos comparativos com os dados descritos na literatura para este composto (BARANDA, et al., 2006).

A Figura 24 apresenta os principais produtos de degradação identificados neste estudo.

Figura 24. Possíveis estruturas do produto de degradação fotoquímica da LER

O produto D1 foi caracterizado pelo espectro de íons produto da seleção do íon de m/z 610. A diferença de massa entre o produto D1 e do material de partida ($\Delta m/z = 2$) sugere uma oxidação do material de partida com formação de uma dupla ligação. O espectro de íons produto apresentado na Figura 25 mostra os íons de m/z 280 e 99, mais intensos indicando que a oxidação não ocorreu na porção amina desta molécula. A diferença de massas de 2 Da foi observado para o íons fragmentos de m/z 385 e 313, sugerindo que a oxidação ocorreu no anel diidropiridina com formação de um anel piridínico.

Figura 25. a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 da LER e b) espectro de íons produto do íon de m/z 610 referente ao produto de degradação D1

O espectro de íons produto para o produto de degradação D2 está apresentado na Figura 26.

Figura 26. a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 da LER e b) espectro de íons produto do íon de m/z 598 referente ao produto de degradação D2

O produto de degradação D2 apresenta uma diferença de massa de 14 Da em relação ao material de partida. Esta diferença de massa sugere a perda de um grupo metileno, indicando uma reação de demetilação da LER. Como pode ser observado no espectro de íons produtos da Figura 27, houve um deslocamento de 14 Da para os íons de m/z 298, 280 e 100 na fragmentação da LER formando os íons de m/z 284, 266 e 86, respectivamente. Desta forma, podemos afirmar que ocorreu uma N-demetilação na LER, como sugerido na Figura 27.

Figura 27. Proposta de fragmentação do produto de degradação D2

Para o produto de degradação D3 foi observada uma diferença de menos 16 Da em relação à massa molecular do material de partida. Com base nos produtos D1 e D2, caracterizados anteriormente, esta diferença de massa sugere a perda de um grupo metileno por N-demetilação e mais uma reação de oxidação com formação do anel piridínico. A Figura 28 apresenta o espectro de íons produto do produto de degradação D3.

Figura 28. a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 da LER e b) espectro de íons produto do íon de m/z 596 referente ao produto de degradação D3

A presença dos íons fragmentos de m/z 266 e 86 confirmam a reação de N-demetilação do material de partida e o íon de m/z 313 confirma a reação de oxidação com formação do anel piridínico, como apresentado na Figura 29.

Figura 29. Proposta de fragmentação do produto de degradação D3

Também foi caracterizado outro produto de degradação denominado D4. Este produto apresenta uma diferença de 30 Da em relação ao material de partida. A caracterização estrutural deste produto foi realizada com base nos íons fragmentos identificados nos produtos anteriormente. O espectro de íons produtos está apresentado na Figura 30.

Figura 30. a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 da LER e b) espectro de íons produto do íon de m/z 582 referente ao produto de degradação D4

Os íons de m/z 284, 266 e 86 foram atribuídos aos fragmentos produzidos pela reação de N-demetilação, semelhante ao resultado observado para o produto de degradação D2. O íon de m/z 298 foi atribuído ao fragmento produzido pela reação de oxidação do anel diidropiridina seguida da hidrólise do éster metílico, como apresentado na Figura 31.

amina degradada na LER. A presença destes dois íons confirma a estrutura proposta para este produto de degradação (Figura 33).

Figura 33. Proposta de fragmentação do produto de degradação D5

O íon de m/z 425 presente no espectro de massas do bruto reacional como o sinal mais intenso, também foi submetido a estudos de fragmentação induzida por colisão. O espectro de íon produto obtido está apresentado na Figura 34.

Figura 34. a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 LER e b) espectro de íons produto do íon de m/z 425

Porém, os íons fragmentos observados no espectro de CID não são coincidentes com nenhum dos dois íons fragmentos identificados neste estudo. Desta forma, não foi possível atribuir nenhuma estrutura para este íon.

Um fato interessante observado no espectro de massas do bruto reacional (Figura 35), foi a formação de íons com m/z acima do íon esperado para a LER (m/z 612). Para processo de degradação fotoquímica é esperado a perda de grupos substituintes com consequente diminuição da massa molecular em relação ao material de partida. Assim os íons de m/z 660 foi submetido a estudos de fragmentação induzida por colisão. O espectro de íon produto obtido para o íon de m/z 660 esta apresentado na Figura 35.

Figura 35. a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 da LER e b) espectro de íons produto do íon de m/z 660 referente ao produto de degradação D6

Os íons fragmentos de m/z 298, 280 e 100, foram atribuídos à porção amina presente no material de partida. Este resultado indica que a porção amina permanece inalterada para este produto. O íon de m/z 628 foi atribuído à perda de CH_3OH (32 Da), este padrão de fragmentação não havia sido observado em nenhum dos produtos de degradação estudados até o momento. Esta perda de 32 Da sugere a entrada de uma molécula de metanol, a qual deve ser proveniente do meio reacional. A ausência do íon de m/z 315 indica que a modificação estrutural ocorreu na porção dihidropiridina.

Os íons de m/z 363 e 435 presentes no espectro de fragmentação do íon de m/z 660, apresentam uma diferença de massa de 48 Da referente aos íons 315 e 387 formados da fragmentação do material de partida. Levando-se em consideração a entrada de uma metoxila proveniente do meio reacional, a diferença de massa sugere a entrada de mais uma hidroxila, assim metoxila (31 Da) + hidroxila (17 Da) são iguais aos 48 Da observado para o produto de degradação estudado. Este composto foi denominado como produto de degradação D6, sua possível estrutura e a proposta de fragmentação estão apresentadas na Figura 36.

Figura 36. Proposta de fragmentação do produto de degradação D6

O íon de m/z 646 também foi submetido a estudo de fragmentação induzida por colisão. O espectro obtido para este íon está apresentado na Figura 37 em conjunto com os espectros de íons produto do material de partida e do produto de degradação D6.

Figura 37. a) Espectro de íons produto do íon de m/z 612 da LER, b) espectro de íons produto do íon de m/z 646 e c) espectro de íons produto do íon de m/z 660

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método simples e rápido para análise dos enantiômeros da LER por CE usando TM- β -CD como seletor quiral e tampão acetato de sódio 200 mmol L⁻¹ como de eletrólito de corrida. Nestas condições, os enantiômeros da LER migraram com tempo menor que 14 minutos, com uma resolução de 2,0 e eficiência de 356,960 e 327,124 para S- e R-LER, respectivamente. O método foi validado e aplicado no controle de qualidade de formulações comerciais de LER. Além disso, foi realizado estudos de fotodegradação para avaliar a estabilidade da LER após exposição à luz UV e luz visível. Os estudos de fotodegradação foram realizados por HPLC usando a coluna Chiralpak[®] AD 250 $\times$ 4.6 mm, partículas de 10 μ m e fase móvel composta por hexano:etanol:dietilamina (97:3:0,3, v/v/v). Os resultados obtidos no estudo de fotodegradação confirmaram a sensibilidade da LER após 0,5 h de exposição à radiação UV (cerca de 30 % de degradação para ambos os enantiômeros) e luz visível (cerda de 21% de degradação para o enantiômero S-, e 12% para o enantiômero R-). Além disso, foi realizada a caracterização dos produtos de degradação da LER por LC/MS/MS, e a principal fragmentação ocorre no anel dihidropiridínico, assim como para outros fármacos desta classe, formando piridinas sem efeitos farmacológicos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, F.A., GAITANI, C.M., BORGES, K.B. Capillary electrophoresis method for the determination of isradipine enantiomers: Stability studies and pharmaceutical formulation analysis. **Electrophoresis**.v. 32, p. 2673–2682, 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RE n° 899**, 29 de maio de 2003.
- AGRANAT, I.; WAINSCHEIN, S. R. The strategy of enantiomer patents of drugs. **Drug Discovery Today**.v. 15, p. 163-170, 2010.
- ÁLVAREZ-LUEJE, A., PUJOL, S., SQUELLA, J.A., NÚÑEZ-VERGARA, L.J.A selective HPLC method for determination of lercanidipine in tablets.**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 31, p. 1-9, 2003.
- ASSUNÇÃO, N. A. et al. Eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (CE-MS): vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 31, p. 2124-2133, 2008.
- BARANDA, A.B., ALONSO, R.M., JIMENEZ, R.M., WEINMANN, W. Instability of calcium channel antagonists during sample preparation for LC-MS-MS analysis of serum samples. **Forensic Science International**. v. 156, p. 23–34, 2006.
- BLANCO,M.; VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, 2003.
- BOATTO, G., NIEDDU, M., FAEDDA, M. V., DE CAPRAIIS, P., Enantiomeric separation by HPLC of 1,4-dihydropyridines with vancomycin as chiral selector. **Chirality**. v. 15, p. 494–497, 2003.
- BONATO, P. S.; JABOR, V. P. A.; GAITANI, C. M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 28, p. 683-91, 2005.
- BONATO, P. S.; de GAITANI, C. M.; JABOR, V. A. P.. Drugs in body fluids: analysis bt capillary electrophoresis. In: CAZES, J. **Encyclopedia of Chromatography**. 3^a ed. London: Taylor & Francis, 2009, p. 277-282.
- BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; de OLIVEIRA, A. R. M. Analyses chiral drugs in body fluid. In EECKHAUT, A. V.; MICHOTTE, Y. **Chiral Separation by Capillary Electrophoresis**.Boca Raton: CRC Press, 2010. Cap. 12, p. 341-361.

BUCKLEY, N., DAWSON, A., WHYTE, I. Calcium channel blockers. **Medicine**. v. 35, p. 599-602, 2007.

BORALLI, V.B et al. Enantioselectivity in the pharmacokinetic interaction between fluvastatin and lercanidipine in healthy volunteers. **The Journal of Clinical Pharmacology**, p.205-211, 2009.

BORGES, E. M; BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C. H. Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. **Química Nova**,v. 33, p. 945-953, 2010.

BRITO, N. M. et al., Validação de métodos analíticos: estartégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**,v. 13, p. 129-146, 2003.

CARGNONI, A., BENIGNO, M, FENARI, F., et al. Effects of lercanidipine and its enantiomers on ischemia and reperfusion. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**,v. 29, p. S48-S62, 1997.

CHASIN, A. A. M, et al. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Revista Farmacêutica e Bioquímica de São Paulo**, v. 11, p 1-6, 1998.

CHASIN, A. A. M.; CHASIN, M.; SALVATORI, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Revista Farmacêutica e Bioquímica de São Paulo**, v. 30, p 41-46, 1994.

CORSINI, A., et al. Effect of the new calcium antagonist lercanidipine and its enantiomers on the migration and proliferation of arterial myocytes. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**,v. 28, p. 687-694, 1996.

DE LORENZI, E.,et al. Evaluation of quail egg white riboflavin binding protein as a chiral selector in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**,v. 790, p. 47-64, 1997.

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

FAKHARI, A. R. et al. Development of a stability-indication CE assay for the determination of amlodipine enantiomers in commercial tablets. **Electrophoresis**, Weinhein, v. 29, p. 4583-4592, 2008.

FANALI, S., Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors, **Journal of Chromatography A**, p. 89–122, 2000.

FANALI, S., Chiral separations by CE employing CDs. **Electrophoresis**, v. 30, p. S203–S210, 2009.

FEDERSEL, H. J. Drug chirality-scale-up, manufacturing and control. **Chemtech.**, v. 23, p. 24-33, 1993.

FIORI, J., et al. Investigation on the photochemical stability of lercanidipine and its determination in tablets by HPLC–UV and LC–ESI–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41, p. 176–181, 2006.

HUTT, A. J.; VALENTOVÁ, J. The chiral switch: the development of single enantiomer drugs from racemates. **Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comeninae**, v. 50, p. 7-23, 2003.

GERVASIO, et.al, Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de com plasma: uma ferramenta eficiente para a especiação. **Química Nova**, v. 26, p. 65-74, 2003.

GIEND, C.S.V. Theoretical considerations in performance of various modes of CE. **Capillary electrophoresis methods for pharmaceuticals analysis**. London, In: Academic Press, 2008, v. 9, Cap. 6, p. 123-143.

GODFRAIND, T. Classification of calcium antagonists. **The American Journal of Cardiology**. v. 59, p. B11- B23, 1987.

GOODMAN, A., RALL, T. W., NIES, A. S., TAYLOR, P., **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 8th edition, McGraw-Hill, New York, 1992.

GUARNERI, L., et al. In vitro and in vivo vascular selectivity of lercanidipine and its enantiomers. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v.29, p. S25-S32, 1997.

GÜBITZ, G.; SCHMID, M.G. Chiral separation by capillary electromigration techniques. **Journal of Chromatography A**, p.140–15, 2008.

HARRIS, D. C. Métodos cromatográficos e eletroforese capilar. In: HAARIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2005. Cap. 26, p. 643-650.

HEUERMAN, M., BLASCHKE, G. Chiral separation of basic drugs using cyclodextrins as chiral pseudo-stationary phases in capillary electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. v. 648, p. 261-274, 1993.

HEYDEN, Y.V., et al. Hanbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC, **Carolina do Norte: Satinder Ahuja**, v.6, p.447-489, 2005.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION - ICH (2005). **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland.

IVANA, I.; LJILJANA, Z.; MIRA, Z. A stability indicating assay method for cefuroxime axetil and its applicatiion to analysis to tablets exposed to accelerated stability test condition. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, p. 209–215, 2006.

JABOR, V.A.P et.al.Enantiosseletive determination of lercanidipine in human plasma for pharmacokinetic studies by normal-fase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, p.429-437, 2003.

JABOR, V.A.P et.al; COELHO, E. B.; LANCHOTE, V. L. Eantioselective pharmacokinetics of lercanidipine in healthy volunteers. **Journal of Chromatography B**, v. 813, p. 343-346, 2004.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; GUIMARÃES, L. F. L. **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. In: Fundamentos de Cromatografia. 1ª ed., 2006, Cap. 9, p. 273-397.

JIMIDAR, M. I. Theoretical considerations in performance of various modes of CE. **Capillary electrophoresis methods for pharmaceuticals analysis**. London, In: Academic Press, 2008, v. 9, Cap. 2, p. 9-42.

KAILA, H. O et al. A stability-indicating hight performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of atenol and lercanidipine hydrochloride in tablets. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 376-380, 2011.

KAILA, H. O et al.A stability-indicating HPLC method for assay of lercanidipine hydrochloride in tablets and for determining content uniformity. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, p. 381-384, 2010.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. **Capillary Electrophoresis: Principle and Practice**. 1ª ed. Berlin: Springer Laboratory, 1993.

KELLY, M. A.; ALTRIA, K. D.; CLARK, B. J. Approaches used in the reduction of buffer electrolysis effects for routine capillary electrophoresis procedures in pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 768, p.73-80, 1997.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004.

LEONARDI, A., et al. In vitro calcium antagonist activity of lercanidipine and its enantiomers. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 29 (Supl. 1), S10–S18.

LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, p.657 – 663, 1997.

LINDNER, W., BÖHS, B., SEIDEL, V. Enantioselective capillary electrophoresis of amino acid derivatives on cyclodextrin: Evaluation of structure-resolution relationships, **Journal of Chromatography A**, v. 697, p. 549-560, 1995.

LOFTSSON, T., BREWSTER, M. E., Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.62, p.1607–1621, 2010.

MALLAMPATI, S. et al. CE in impurity profiling of drugs. **Separation Science and Technology**, v. 9, p. 259-315, 2008.

MARUSZAK, W. et al. Separation of enantiomers by capillary electrophoresis using cyclodextrins. In: **Chiral Separation Methods and Protocolos**, v. 243, 2004, Cap. 14, p. 265-274.

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

MORANTE-ZARCERO, A. L. et al. Chiral capillary electrophoresis applied to the determination of phenylglycidol enantiomers obtained from cinnamyl alcohol by asymmetric epoxidation using new titanium(IV) alkoxide compounds as catalysts. **Electrophoresis**, v. 25, p. 2745–2754, 2004.

NOTARBARTOLO, A., RENGO, F., SCAFIDI, V., ACANFORA, D. Long-Term Effects of Lercanidipine on the Lipoprotein and Apolipoprotein Profile of Patients with Mild-to-Moderate Essential Hypertension. **Current Therapeutic Research**.v. 60, p. 228-236, 1999.

PARMAR, N., SINGLA, N., AMIN, S., KOHLI, K. Study of cosurfactant effect on nanoemulsifying area and development of lercanidipine loaded (SNEDDS) self nanoemulsifying drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 86, p. 327–338, 2011.

PASCHOAL, J. A. R, et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008.

PERRETT, D. Capillary electrophoresis for drugs analysis. In: A. C. MOFFAT, M. D OSSELTON e B WIDDOP (Ed.). **Clarke's analysis of drugs and poisons: Pharmaceuticals Press**, v. 1, p. 535-549., 2003.

PIERRIM, C. et al. Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals Part I. Normal-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 947, p. 69-83, 2002.

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

SMITH, S.W. Chiral Toxicology: It's the Same Thing Only Different. **Toxicological Sciences**, v.110, p. 4–30, 2009.

RIBANI, M. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIGHETTI, P. G. et al. Capillary zone electrophoresis. In: HEFTMANN, E. **Chromatography**. 6^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. Cap 9, p. 369-402.

RIZZI, A. Fundamental aspects of chiral separation by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**. v. 22, p. 3079-3106, 2001.

ROZET, E.; MARINI, R. D.; ZIEMONS, E.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 55, p. 848 – 858, 2011.

SALEM, I.I., et al. Selective and rapid liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of lercanidipine in human plasma. **Journal of Chromatography B**.v. 803, p. 201–207, 2004.

SCRIBA, G.K.E. Fundamental aspects of chiral electromigration techniques and application in pharmaceutical and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** n.55, p.688–701, 2011.

SERVAIS, A.C., CROMMEN, J., FILLET M., Factor Influencing Cyclodextrin-Mediated Chiral . In: **Chiral separations by capillary electrophoresis** (Chromatographic science series ; v.100), Boca Raton: CRC Press, 2010, p. 87-108.

SILVA, J. A. F et al., Terminologia para técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 740-744, 2007.

SILVA, K. E. R. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica Aplicada**, v. 30, p.1-8, 2009.

SKOOG, D. A. Eletroforese Capilar e Eletrocromatografia. **Princípios da Análise Fundamental**. 8^a ed. Porto Alegre, Bookman, 2008. Cap. 30, p. 946-963.

SMITH, S.W. Chiral Toxicology: It's the Same Thing Only Different. **Toxicological Sciences**, v.110, n.1, p. 4–30, 2009.

SNEYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Basic concepts and the control of separation**. In: Introduction to modern Liquid Chromatography, 3^a, 2010, Cap. 2 p. 19-83.

SOARES, L.C. Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos. **Manole**, p.266-277, 2006.

STALCUP, A.M. Chiral separations by capillary electrophoresis. In: **Chiral Analysis**. Oxford: Elsevier, 2006.

TACHIBANA, K.; OHNISHI, A. Reverse-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. **Journal Chromatography A**, v. 906, p. 127-54, 2001.

TANAKA, Y.; TERABE, S. Recent advances in enantiomer separations by affinity capillary electrophoresis using proteins and peptides, **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 48, p. 103–116, 2001.

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

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

TESTA, R., LEONARD, A., TAJANA, A., RISCASSI, E., MAGLIOCCA, R., SARTANI, A. Lercanidipine (Rec 15/2375): A Novel 1,4-Dihydropyridine Calcium Antagonist for Hypertension. **Cardiovascular Drug Reviews**.v. 15, p. 187-219, 1997.

THOMPSON, R. A practical guide to HPLC enantioseparation for pharmaceutical compounds. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.**, v. 28, p. 1215-1231, 2005.

UNITED STATES PHARMACOPEIA – USP. (2007). **The United States Pharmacopeial Convention**, Validation of Compendial Procedures, Chap. 1225, Rockville, pp. 680–683.

WEINBERGER, R. Capillary zone electrophoresis. **Practical capillary electrophoresis**, 2^aed. New York: Academic Press, 2000. Cap. 2, p. 25-70.

YAMAMOTO, C.; OKAMOTO, Y. Chiral Separation by HPLC Using Polysaccharide-based chiral stationary phases. In: **Chiral Separation Methods and Protocols**, v. 243, 2004, Cap. 5, p. 173-182.

ZHANG, Y. et al., Enantioselective chromatography in drug discovery. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 10, p. 571-577, 2005.