UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Aplicações da eletroforese capilar na análise do biomarcador
alfa-1 glicoproteína ácida, no controle de qualidade do
biofármaco interferon alfa 2a e na avaliação da estabilidade
enantiosseletiva do fármaco isradipina**

Fernando Armani Aguiar

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Aplicações da eletroforese capilar na análise do biomarcador alfa-1
glicoproteína ácida, no controle de qualidade do biofármaco
interferon alfa 2a e na avaliação da estabilidade enantiosseletiva do
fármaco isradipina

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

Área de Concentração:
Medicamentos e Cosméticos.

Orientado: Fernando Armani Aguiar

*Orientadora: Prof(a). Dr(a) Cristiane
Masetto de Gaitani*

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 08 de Agosto de 2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2013

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Aguiar, Fernando Armani

Aplicações da eletroforese capilar na análise do biomarcador alfa-1 glicoproteína ácida, no controle de qualidade do biofármaco interferon alfa 2a e na avaliação da estabilidade enantiosseletiva do fármaco isradipina. Ribeirão Preto, FCFRP – USP, Maio, 2013.

158 p.: il.; 30 cm

Tese apresentada ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP – USP para defesa do curso de Doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação, área de concentração de Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: de Gaitani, Cristiane Masetto.

1. Eletroforese capilar 2. Alfa1-AGP. 3. IFN alfa-2a. 4. Isradipina. 5. Controle de Qualidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Armani Aguiar

Aplicações da eletroforese capilar na análise do biomarcador alfa-1 glicoproteína ácida, no controle de qualidade do biofármaco interferon alfa 2a e na avaliação da estabilidade enantiosseletiva do fármaco isradipina.

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Cristiane
Masetto de Gaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus pais, **Ademar e Elza,***

*pelo amor, carinho, alegrias, ensinamentos e educação, que sempre servirão
como modelos de dedicação e trabalho.*

*Aos meus irmãos, **Rafael e Renato,***

pelo amor, diálogos, discussões, alegrias e tudo mais....

*À **Gabriela,***

pelo amor, carinho, diálogos, incentivos e companheirismo.

Agradecimentos

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

*Aos meus pais **Ademar** e **Elza** pela vida, carinho, incentivo e esforço para me proporcionar a melhor educação possível.*

*Aos meus irmãos **Rafael** e **Renato**, meus melhores amigos. Eu não teria conseguido estar onde estou se vocês não existissem.*

*À **Gabriela** pelo carinho e vida compartilhada nestes anos. Por incentivar e compartilhar todos os momentos da minha vida e principalmente desse projeto com dedicação e amor.*

*À **Profª Drª Cristiane Masetto de Gaitani**, minha orientadora, a quem devo a oportunidade de conclusão do meu Doutorado, por ter aceitado me orientar. Agradeço também por ser um exemplo de orientadora, sempre gentil e comprometida na formação de recursos humanos. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão.*

*À **Profª Drª Glória Emília Petto de Souza**, a **Profª Drª Pierina Sueli Bonato** e ao **Profª. Dr Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira**, pelo apoio e contribuição em minha formação científica.*

*À toda **minha família** por torcer e sempre acreditar em mim.*

*Aos **amigos** do laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP: Aline Ishikawa, Ana Débora, Greyce Kelly, Luiza Saldanha, Luciana Lourenço, Rodrigo Moreira, Jennifer Yokoya, Lanuze Toni, Luiz Fernando e Ivelise Gavarron pela amizade e apoio em todos os momentos e pelas discussões científicas.*

*Aos **amigos** dos laboratórios de Farmacologia da USP de Ribeirão Preto: Alexandre Kanashiro, David do Carmo Malvar, Débora Assis, Fabrício O. Souto, Sabrina Malvar, Miriam Cristina Contin Melo, Juliana Aparecida Vercesi, Marlene Rodrigues da Silva e Maria Aparecida Rose da Silva pelas alegrias, pela amizade, paciência e contribuição para o meu crescimento científico e humano.*

*Aos **amigos** do laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar, Keyllér Bastos, Leandro Calixto, Luciana Ângulo, Milena Tonon, Rodrigo Simões, Thiago Barth e Valquíria Jabor pelas discussões, convívio e amizade.*

*Aos **professores, funcionários e alunos** do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, pelo apoio constante e em especial às funcionárias da seção de pós-graduação: Aninha, Eleni e Rosana Florencio pela amizade.*

*A todos **os amigos das moradias da pós-graduação**, pela convivência, amizade e pelos momentos de alegria.*

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

*A **Capes** pelo suporte financeiro.*

RESUMO

AGUIAR, F.A. **Aplicações da eletroforese capilar na análise do biomarcador alfa-1 glicoproteína ácida, no controle de qualidade do biofármaco interferon alfa 2a e na avaliação da estabilidade enantiosseletiva do fármaco isradipina.** 2013. 158f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A eletroforese é uma técnica de separação que se baseia na migração diferencial de compostos iônicos em tubo capilar semicondutor, preenchido com solução eletrolítica, sob a influência de campo elétrico. Na introdução desta tese, princípios, métodos e diferentes tipos de técnicas de eletromigração em capilar foram discutidos. No primeiro capítulo são mostrados os resultados de otimização e validação de um método eletroforético para a determinação das glicoformas da α 1-Glicoproteína Ácida, um biomarcador. A otimização das condições eletroforéticas usando eletrólito de corrida constituído por tricina (10 mmol L^{-1}), cloreto de sódio (10 mmol L^{-1}), acetato de sódio (10 mmol L^{-1}), ureia (7 mol L^{-1}) e putrescina ($3,9 \text{ mmol L}^{-1}$), pH de 4,5, tensão de 30 kV, e temperatura de análise de 35°C levou à resolução mínima de aproximadamente 1,5 entre as oito glicoformas encontradas. Todas as análises foram realizadas em um capilar de sílica fundida não revestido internamente, diâmetro interno de $50 \mu\text{m}$ e comprimento efetivo de 50,0 centímetros. Após a otimização, o método foi validado, em que a linearidade foi obtida no intervalo de 0,125 a $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ($r \geq 0,993$). O coeficiente de variação (%) e erros relativos (%) obtidos nos estudos de precisão e exatidão, respectivamente, intra e inter-dias foram inferiores a 15 %. Após a validação o método foi aplicado para a análise da α 1-AGP em amostras de plasma de pacientes com sepse, o qual demonstrou uma variabilidade na concentração da glicoformas. No segundo capítulo, um método simples, rápido e econômico por eletroforese capilar, foi desenvolvido e validado para a determinação de Interferon alfa-2a, um biofármaco, em formulação farmacêutica. Após otimização, os melhores resultados foram obtidos utilizando solução tampão tetraborato de sódio 30 mmol L^{-1} , e pH 8,50, com 50 mmol L^{-1} de dodecil sulfato de sódio. A tensão aplicada foi de 25 kV e a injeção da amostra foi realizada no modo hidrodinâmico. Todas as análises foram realizadas em capilar de sílica fundida não revestido internamente, diâmetro interno de $75 \mu\text{m}$ e comprimento efetivo de 50,0 centímetros. Sob estas condições, a análise foi realizada em menos de 10 min. A linearidade foi obtida no intervalo de 0,41-1,54 MUI mL^{-1} ($r \geq 0,997$). O coeficiente de variação (%) e erros relativos (%) obtidos nos estudos de precisão e exatidão, respectivamente, intra e inter-dias foram inferiores a 5 %. Após a validação o método foi aplicado no controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo o Interferon alfa-2a. No terceiro capítulo, um método enantiosseletivo simples por eletroforese capilar usando ciclodextrina como seletor quiral foi desenvolvido e validado para a determinação dos enantiômeros da isradipina, um bloqueador de canal de cálcio, em formulação farmacêutica. Além disso, foi realizado estudo de estabilidade dos enantiômeros da isradipina submetidos à oxidação, hidrólise (ácida e alcalina) e fotólise. A resolução completa dos enantiômeros da isradipina foi obtida em menos de 7 minutos utilizando solução tampão borato de sódio 15 mmol L^{-1} e pH 9,3 e sulfobutil éter- β -ciclodextrina (2,5 %, m/v) como seletor quiral. A tensão aplicada foi de 30 kV, e a injeção da amostra foi realizada no modo hidrodinâmico. Todas as análises foram efetuadas em capilar de sílica fundida não revestido internamente e diâmetro interno de $50 \mu\text{m}$ e comprimento efetivo de 50 centímetros. A linearidade foi obtida no intervalo de 25 - $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos enantiômeros ($r \geq 0,998$). O coeficiente de variação (%) e erros relativos (%) obtidos nos estudos de precisão e

exatidão, respectivamente, intra e inter-dias foram inferiores a 5 %. Após o método ter sido validado, este foi aplicado na análise de formulações farmacêuticas contendo os enantiômeros da isradipina. Nos estudos de estabilidade foi observada degradação dos enantiômeros em todas as condições avaliadas. Assim, de acordo com os resultados obtidos após o desenvolvimento dos três métodos, pode ser concluído que a eletroforese capilar é uma poderosa técnica de separação com aplicações na investigação, desenvolvimento, controle de qualidade e estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos. Além disso, a eletroforese capilar é uma técnica complementar à cromatografia líquida de alta eficiência, que oferece vantagens como simplicidade, rapidez, baixo custo e consumo de solventes e reagentes e diferentes mecanismos de seletividade, podendo ser aplicada em diferentes tipos de amostras.

Palavras-chave: Eletroforese capilar, Alfa1-glicoproteína ácida, Interferon alfa-2a, Isradipina, Controle de qualidade.

ABSTRACT

AGUIAR, F.A. **Applications of capillary electrophoresis in the analysis of biomarker alpha-1 acid glycoprotein, in the quality control of the biodrugs interferon alpha 2a, and enantioselective stability evaluation of drug isradipine.** 2013. 158f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Electrophoresis is a separation technique that is based on the differential migration of charged compounds in a semi-conductive medium under the influence of an electric field. In the introduction of this thesis, principles, methods, and different types of electromigrations techniques in capillary were discussed. In the first chapter shows the results of optimization and validation of a electrophoretic method for determining the glycoforms of α 1-AGP. The running buffer after optimization consisted of Tricine (10 mmol L^{-1}), sodium chloride (10 mmol L^{-1}), sodium acetate (10 mmol L^{-1}), urea (7 mol L^{-1}) and putrescine (3.9 mmol L^{-1}), pH 4.5, voltage (30 kV), temperature and analysis (35°C) led to resolution of at least of 1.5 among the eight glycoforms found. All analyses were carried out in a fused-silica uncoated capillary with an id of $50 \mu\text{m}$ and effective length of 50.0 cm. After optimization method was validated in which the linearity was obtained in the range to 0.125 to 2.5 mg mL^{-1} ($r \geq 0.993$). The coefficient of variation (%) and relative errors (%) obtained in the studies of precision and accuracy, respectively (intra-day and inter-day) were less than 15 %. After method validation, the analysis of α 1-AGP in plasma of septic patients was performed, which showed variability in the concentration of glycoforms. In the second chapter a simple CE based method was developed and validated for the determination of Interferon alpha-2a in a pharmaceutical formulation. After optimization, the best results were obtained using 30 mmol L^{-1} tetraborate buffer at pH 8.50 with 50 mmol L^{-1} of sodium dodecyl sulfate. The applied voltage was 25 kV, and the sample injection was performed in the hydrodynamic mode. All analyses were carried out in a fused-silica uncoated capillary with an id of $75 \mu\text{m}$ and effective length of 50.0 cm. Under these conditions, the analysis was achieved in less than 10 min. Linearity was obtained in the range $0.41\text{-}1.54 \text{ MIU mL}^{-1}$ ($r \geq 0.997$). The RSD (%) and relative errors (%) obtained in precision and accuracy studies (intra-day and inter-day) were lower than 5 %. Therefore, this method was found to be appropriate for controlling pharmaceutical formulations containing Interferon alpha-2a. In the third chapter a simple enantioselective method based on CE using CD as chiral selector was developed and validated for the determination of isradipine (IRD) enantiomers in a pharmaceutical formulation and for the determination of IRD enantiomers in degradation studies. After optimization, the best results were obtained using 15 mmol L^{-1} borate buffer at pH 9.3 and sulfobutyl ether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD) (2.5 %, w/v) as chiral selector. The applied voltage was 30 kV, and the sample injection was performed in the hydrodynamic mode. All analyses were carried out in a fused-silica uncoated capillary with an internal diameter of $50 \mu\text{m}$ and effective length of 50 cm. Under these conditions, a complete separation between IRD enantiomers was achieved in less than 7 min. Linearity was obtained in the range $25\text{-}150 \mu\text{g mL}^{-1}$ for both enantiomers ($r \geq 0.998$). The RSD (%) and relative errors (%) obtained in precision and accuracy studies (intra-day and inter-day) were lower than 5 %. Therefore, this method was found to be appropriate for controlling pharmaceutical formulations containing IRD enantiomers and the assay was considered stability indicating. The drug was subjected to oxidation, hydrolysis and photolysis. In all stress conditions the drug presented considerable degradation. According to such results, the capillary electrophoresis showed is a powerful separation technique to

research and development, quality control, and stability studies of pharmaceuticals. CE offers several advantages over high-performance liquid chromatography (HPLC), a technique commonly used in pharmaceutical analysis. These include simplicity, rapid analysis, automation, different mechanisms for selectivity, and low cost.

Keywords: Capillary electrophoresis, Alpha1-acid glycoprotein, Interferon alpha-2a, Isradipine and Quality Control.

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Desenho esquemático dos principais componentes do sistema de eletroforese capilar.....	2
Figura I.2. Representação do modelo de dupla camada. Adaptado de Jimidar (2008).....	8
Figura I.3. Representação esquemática da migração compostos carregados na presença do EOF. Adaptado de Kitagishi (1996).....	10
Figura I.4. Perfil de fluxo: a) hidrodinâmico (sistema dirigido por pressão) e b) eletrosmótico (sistema dirigido eletricamente). Adaptado de Jimidar (2008).....	11
Figura I.5. Estruturas da α -CD, β -CD e γ -CD. Adaptado de Venturini et al.(2008).....	17
Figura 1.1. Estrutura cristalina da α 1-AGP recombinante humana sem glicosilação. C - representa a extremidade carboxi-terminal e N - extremidade amino-terminal. Adaptado de Scirè et al. (2013).	37
Figura 1.2. Eletroferograma referente à análise da α 1-AGP, mostrando as diferentes glicoformas. A análise foi realizada usando um capilar de sílica fundida (50,0 μ m diâmetro interno e 70 cm comprimento efetivo), eletrólito de corrida constituído por solução tampão acetato de sódio 50 mmol L ⁻¹ com pH de 4,5 adicionado de polissobato 20 0,5 % (v/v). Tensão aplicada 20 kV; Temp. 35 °C e injeção hidrodinâmica (50 mbar, 30 s).....	49
Figura 1.3. Eletroferograma referente à análise da α 1-AGP, mostrando as diferentes glicoformas (G1 – G8). A análise foi realizada usando capilar de sílica fundida (50,0 μ m diâmetro interno e 70 cm comprimento efetivo), eletrólito de corrida constituído por 10 mmol L ⁻¹ tricina, 10 mmol L ⁻¹ cloreto de sódio, 10 mmol L ⁻¹ acetato de sódio, 7 mmol L ⁻¹ ureia, 3,9 mmol L ⁻¹ putrescina, com pH de 4,5. Tensão aplicada 30 kV; Temp. 35 °C e injeção hidrodinâmica (50 mbar, 30 s).	50
Figura 1.4. Efeito do comprimento efetivo do capilar no (A) Tempo de migração (referente ao tempo de migração da glicoforma 8) e (B) Resolução (entre as glicoformas 4 e 5). A análise foi realizada usando capilar de sílica fundida (50,0 μ m diâmetro interno), 10 mmol L ⁻¹ tricina, 10 mmol L ⁻¹ NaCl, 10 mmol L ⁻¹ acetato de sódio, 7 mol L ⁻¹ ureia, 3.9 mmol L ⁻¹ putrescina, pH 4,5 como eletrólito de corrida. Tensão aplicada 30 kV; Temp. 35°C e Injeção hidrodinâmica (50 mbar, 30 s).	51
Figura 1.5. Efeito da concentração de ureia (A) Tempo de migração (referente ao tempo de migração da glicoforma 8) e (B) Resolução (entre as glicoformas 4 e 5). A análise foi realizada usando um capilar de sílica fundida (50,0 μ m diâmetro interno x 50,0 comprimento efetivo), 10 mmol L ⁻¹ tricina, 10 mmol L ⁻¹ NaCl, 10 mmol L ⁻¹ acetato de sódio, 3,9 mmol L ⁻¹ putrescina, pH 4,5 como eletrólito de corrida. Tensão aplicada 30 kV; Temp. 35°C e Injeção hidrodinâmica (50 mbar, 30 s).	52
Figura 1.6. Eletroferograma referente à análise da α 1-AGP, mostrando as diferentes glicoformas (G1 – G8). A análise foi realizada usando capilar de sílica fundida (50 μ m diâmetro interno e 50 cm comprimento efetivo), 10 mmol L ⁻¹ tricina, 10 mmol L ⁻¹ NaCl, 10 mmol L ⁻¹ acetato de sódio, 7 mol L ⁻¹ ureia, 3,9 mmol L ⁻¹ putrescina, pH 4,5 como eletrólito de corrida. Tensão aplicada 30 kV; Temp. 35°C e Injeção hidrodinâmica (50 mbar, 30 s).....	52

Figura 1.7. Eletroferograma de plasma de voluntário sadio (A), paciente com sepse grave (B) e choque séptico (C). Condições de análise vide figura 1.6. 58

Figura 2.1. Representação esquemática do IFN α -2a. Adaptado de Klaus et al. (1997)..... 69

Figura 2.2. Eletroferogramas mostrando a análise do IFN α -2a em solução tampão fosfato de sódio 100 mmol L⁻¹ com diferentes valores de pH (A – 4,5; B – 7,4; C – 8,0). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 75 μ m e 50 cm de comprimento efetivo, tensão de 20 kV (modo positivo), Temp. 20 °C e injeção hidrodinâmica a 0,5 psi por 10 s. 79

Figura 2.3. Eletroferogramas mostrando a análise do IFN α -2a em solução tampão tetraborato de sódio 100 mmol L⁻¹ com diferentes valores de pH (A – 8,5; B – 9,0; C – 9,5). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 75 μ m e 50 cm de comprimento efetivo, tensão de 20 kV (modo positivo), Temp. de 20 °C e injeção hidrodinâmica a 0,5 psi por 10 s. 80

Figura 2.4. Eletroferogramas mostrando a análise do IFN α -2a em solução tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ com valor de pH de 8,5 com adição de aditivos (A – 25 mmol L⁻¹ de LiCl; B – 50 mmol L⁻¹ de SDS) . Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 75 μ m e 50 cm de comprimento efetivo, tensão de 20 kV (modo positivo), Temp. de 20 °C e injeção hidrodinâmica a 0,5 psi por 10 s. 81

Figura 2.5. Efeito da concentração da solução tampão tetraborato de sódio no tempo de migração (A) e na eficiência (B) da separação do IFN α -2a. Concentração de SDS de 50 mmol L⁻¹, demais condições de análise vide figura 2.4. *** p < 0,001 quando comparado ao valor correspondente à concentração de 30 mmol L⁻¹. Análises realizadas em duplicata. ... 82

Figura 2.6. Efeito da temperatura no tempo de migração (A) e na eficiência (B) da separação do IFN α -2a. Solução tampão tetraborato de sódio 30 mmol L⁻¹ com valor de pH de 8,5, com adição de SDS 50 mmol L⁻¹ como eletrólito de corrida. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 75 μ m e 50 cm de comprimento efetivo, tensão de 20 kV (modo positivo) e injeção hidrodinâmica a 0,5 psi por 10 s. * p < 0,05 quando comparado ao valor correspondente à temperatura de 25 °C. Análises realizadas em duplicata. 83

Figura 2.7. Eletroferograma obtido após otimização das condições de análise. Condições otimizadas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento efetivo e 75 μ m de diâmetro interno; eletrólito de corrida composto por tampão tetraborato de sódio 30 mmol L⁻¹, solução com valor de pH de 8,5 adicionado de 50 mmol L⁻¹ de SDS; Temp. de 25 °C, tensão 30 kV. Concentração de IFN α -2a: 0,90 MUI mL⁻¹. * picos não identificados..... 83

Figura 2.8. (A) Eletroferograma representativo de amostra do branco (placebo sem adição de IFN α -2a). (B) Eletroferograma representativo de amostra do branco fortificado com 0,90 MUI mL⁻¹ de IFN α -2a. (C) Eletroferograma representativo da solução padrão de IFN α -2a na concentração de 0,90 MUI mL⁻¹. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento efetivo e 75 μ m de diâmetro interno; eletrólito de corrida composto por tampão tetraborato de sódio 30 mmol L⁻¹ pH de 8,5 adicionado de 50 mmol L⁻¹ de SDS; Temp. de 25 °C, tensão 30 kV e detecção UV em 200 nm. (1- pico referente ao IFN α -2a. 2 - pico referente ao polissorbato 80. * pico não identificado). 85

Figura 2.9. Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis e suas interações na: (A) tempo de migração e (B) altura do pico de IFN α -2a. 88

Figura 2.10. Eletroferograma referente à análise do IFN α -2a na formulação farmacêutica. Condições eletroforéticas: vide figura 2.7. (1- pico referente ao IFN α -2a. 2 - pico referente ao polissorbato 80. * pico não identificado)..... 89

Figura 3.1. Estrutura química (A) IRD e (B) impureza D. *Centro quiral. 97

Figura 3.2. Influência de diferentes CD na resolução dos enantiômeros da IRD. A) HP- β -CD (1,0 %, m/v); B) S- β -CD (1,0 %, m/v); C) CM- β -CD (1,0 %, m/v) e D) SBE- β -CD (2,0 %, m/v). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com 50 μ m de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, tampão borato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 9,3, tensão de 20 kV e Temp. de 25 °C. A concentração de cada enantiômero da IRD na amostra analisada foi 100 μ g mL⁻¹. 109

Figura 3.3. Efeito da concentração da solução tampão borato de sódio na resolução (A) e no tempo de migração (B) dos enantiômeros da IRD. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com 50 μ m de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, tampão borato de sódio pH 9,3, tensão de 20 kV e Temp. de 25 °C. A concentração de cada enantiômero da IRD na amostra analisada foi 100 μ g mL⁻¹. 110

Figura 3.4. Efeito da porcentagem de SBE- β -CD na resolução (A) e no tempo de migração (B) dos enantiômeros da IRD. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com 50 μ m de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, tampão borato de sódio 15 mmol L⁻¹, pH 9,3, tensão de 20 kV e Temp. de 25 °C. A concentração de cada enantiômero da IRD na amostra analisada foi 100 μ g mL⁻¹. 111

Figura 3.5. Efeito da temperatura na resolução (A) e no tempo de migração (B) dos enantiômeros da IRD. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com 50 μ m de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, tampão borato de sódio 15 mmol L⁻¹, pH 9,3, tensão de 20 kV, porcentagem de SBE- β -CD de 2,5 %. A concentração de cada enantiômero da IRD na amostra analisada foi 100 μ g mL⁻¹. 112

Figura 3.6. Efeito da tensão na resolução (A) e no tempo de migração (B) dos enantiômeros da IRD. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com 50 μ m de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, tampão borato de sódio 15 mmol L⁻¹, pH 9,3 e Temp. de 25 °C. A concentração de cada enantiômero da IRD na amostra analisada foi 100 μ g mL⁻¹... 113

Figura 3.7. Eletroferograma referente à análise dos enantiômeros da IRD e da impureza D. (1) impureza D; (2) (-)-(R)-IRD e (3) (+)-(S)-IRD. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com 50 μ m de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, tampão borato de sódio 15 mmol L⁻¹, pH 9,3, tensão de 30 kV, Temp. 25 °C, porcentagem de SBE- β -CD de 2,5 %. A concentração de cada enantiômero da IRD na amostra analisada foi 100 μ g mL⁻¹. 114

Figura 3.8. Eletroferogramas típicos de IRD depois de: (A) fotodegradação - UV 254 nm; (B) hidrólise básica; (C) hidrólise ácida; (D) degradação oxidativa. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de diâmetro interno de 50 μ m e 50 cm de comprimento efetivo, solução tampão borato de sódio 15 mmol L⁻¹, pH 9,3 contendo 2,5 % de SBE- β -CD, como eletrólito de corrida, tensão de 30 kV, Temp. de 25 °C, detecção em 239 nm; injeção (50 mbar por 7,5 s). Amostras analisadas após 240 min de incubação..... 116

Figura 3.9. Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis e suas interações na: (A) área (-)-(R)-IRD; (B) área (+)-(S)-IRD; (C) resolução entre (-)-(R)-IRD e (+)-(S)-IRD; (D) tempo de migração de (+)-(S)-IRD..... 118

Figura 3.10. Estudo de degradação dos enantiômeros da IRD ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura racêmica) pela exposição a condição ácida. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão médio (E.P.M.). Os símbolos adjacentes à barra representam o valor de p com nível de significância de 95 %, (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) quando comparado com a amostra fresca. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. 119

Figura 3.11. Estudo de degradação dos enantiômeros da IRD ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura racêmica) pela exposição a condição alcalina. Cada barra representa a média $\pm$ E.P.M. Os símbolos adjacentes à barra representam o valor de p, com nível de significância de 95 %, (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) quando comparado com a amostra fresca. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. 120

Figura 3.12. Estudo de degradação dos enantiômeros da IRD ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura racêmica) pela exposição a degradação oxidativa. Cada barra representa a média $\pm$ E.P.M. Os símbolos adjacentes à barra representam o valor de p, com nível de significância de 95 %, (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) quando comparado com a amostra fresca. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. 121

Figura 3.13. Estudo de fotodegradação dos enantiômeros da IRD em solução metanólica ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura racêmica). Cada barra representa a média $\pm$ E.P.M. Os símbolos adjacentes à barra representam o valor de p, com nível de significância de 95 %, (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) quando comparado com a amostra fresca. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. 122

Figura 3.14. Eletroferograma obtido na análise das cápsulas de IRD. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida não revestido internamente, com diâmetro interno de $50 \mu\text{m}$, 50 cm de comprimento efetivo, empregando solução tampão borato de sódio 15 mmol L^{-1} pH 9,3 adicionado de 2,5 % de SBE- β -CD como eletrólito de corrida, 30 kV de tensão e detecção em 239 nm. As outras condições empregadas foram: injeção hidrodinâmica (pressão de 50 mbar por 7,5 s e Temp. do capilar de 25°C). 123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Estabilidade das glicoformas da α 1-AGP nos ciclos de congelamento/descongelamento, bancada por 12 h e longa duração.....	53
Tabela 1.2. Seletividade do método	54
Tabela 1.3. Linearidade do método	55
Tabela 1.4. Limite de Quantificação do método.....	55
Tabela 1.5. Precisão e Exatidão do método para análise da α -1 AGP.....	56
Tabela 1.6. Determinação da concentração plasmática das glicoformas da α 1-AGP de pacientes com sepse	59
Tabela 2.1. Variáveis selecionadas como fatores e valores escolhidos como níveis para avaliação da robustez do método	77
Tabela 2.2. Resultados do teste <i>system suitability</i> para a análise do IFN α -2a.....	84
Tabela 2.3. Estudo de Estabilidade de bancada do IFN α -2a	85
Tabela 2.4. Linearidade ^a e limite de quantificação do método	86
Tabela 2.5. Precisão e exatidão do método para análise do IFN α -2a.....	87
Tabela 2.6. Avaliação do desempenho do procedimento de filtração	89
Tabela 2.7. Determinação do IFN α -2a em formulação farmacêutica em dois dias consecutivos.....	90
Tabela 3.1. Variáveis selecionadas como fatores e valores escolhidos como níveis para avaliação da robustez do método	105
Tabela 3.2. Teste de estabilidade da solução padrão dos enantiômeros da IRD no auto-injetor.....	114
Tabela 3.3. Resultados do teste <i>system suitability</i> para a análise dos enantiômeros da IRD	115
Tabela 3.4. Linearidade, limite de detecção e quantificação do método	117
Tabela 3.5. Precisão e exatidão do método de análise dos enantiômeros da IRD.....	117
Tabela 3.6. Determinação dos enantiômeros da IRD em cápsulas.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α 1-AGP	Alfa 1 Glicoproteína Ácida
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APACHE II	<i>Acute And Chronic Health Evaluation</i>
APP	Proteínas de fase aguda
CD	Ciclodextrina
CE	Eletroforese capilar
CEC	Eletrocromatografia capilar
CIEF	Focalização isoeletrica capilar
CGE	Eletroforese capilar em gel
CM- β -CD	Carboximetil- β -CD
CMC	Concentração micelar crítica
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CV %	Coefficiente de variação percentual
DHP	Diidropiridinas
DMOS	Disfunção múltipla de órgãos e sistemas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiaminatetracetato de sódio
EOF	Fluxo eletrosmótico
ER %	Erro relativo percentual
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSCE	Eletroforese capilar em solução livre
HP- β -CD	2-Hidroxipropil- β -CD
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IRD	Isradipina
LIF	<i>Laser induced fluorescence</i>

LQ	Limite de quantificação
mab	Anticorpo monoclonal
MEKC	Cromatografia capilar eletrocinética micelar
MUI	Milhões de unidades internacionais
m/v	Massa/volume
NK	<i>Natural Killer</i>
pI	Ponto isoeletrico
PVDF	Poli(fluoreto de vinilideno)
Rs	Resolução
S- β -CD	β -CD Sulfatada
SBE- β -CD	Sulfobutil éter- β -CD
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	X
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. ELETROFORESE CAPILAR	2
1.1. TÉCNICAS DE ELETROMIGRAÇÃO EM CAPILAR.....	3
1.1.1. Eletroforese Capilar em Gel (CGE).....	3
1.1.2. Focalização Isoelétrica Capilar (CIEF).....	4
1.1.3. Eletrocromatografia Capilar (CEC)	4
1.1.4. Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar (MEKC).....	5
1.1.5. Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE).....	6
1.2. ANÁLISE ENANTIOSELETIVA POR ELETROFORESE CAPILAR	12
1.2.1. Fármacos Quirais	13
1.2.2. Fundamentos da Separação Enantiomérica em CE	14
1.2.3. Seletores Quirais.....	16
1.3. ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE CAPILAR.....	19
1.3.1. Biofármacos	20
1.3.2. Biomarcadores	22
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO 1: ANÁLISE DA ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA POR ELETROFORESE CAPILAR EM AMOSTRAS DE PLASMA DE PACIENTES COM SEPSE	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	40
3.2. EQUIPAMENTO E CONDICIONAMENTO DO CAPILAR	40
3.3. PACIENTES	41
3.4. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS	42
3.5. PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	43
3.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48

4.1.	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	48
4.1.1.	<i>Comprimento do Capilar</i>	50
4.1.2.	<i>Concentração de Ureia</i>	51
4.2.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	53
4.3.	ANÁLISE DO PLASMA DE PACIENTES COM SEPSE	57
5.	CONCLUSÕES	61
6.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	62
CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DO BIOFÁRMACO INTERFERON ALFA-2A (IFN A-2A) POR ELETROFORESE CAPILAR..		67
1.	INTRODUÇÃO	68
2.	OBJETIVOS	71
3.	MATERIAL E MÉTODOS	72
3.1.	REAGENTES E SOLUÇÕES	72
3.2.	EQUIPAMENTO E CONDICIONAMENTO DO CAPILAR	72
3.3.	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS.....	73
3.4.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	74
3.5.	ANÁLISE DE IFN A-2A EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA	77
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO.....	78
4.2.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	84
4.3.	APLICAÇÃO DO MÉTODO EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA DE IFN A-2A	88
5.	COMENTÁRIOS FINAIS	91
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE ENANTIOSELETIVA DA ISRADIPINA POR ELETROFORESE CAPILAR.....		96
1.	INTRODUÇÃO	97
2.	OBJETIVOS	99
3.	MATERIAL E MÉTODOS	100
3.1.	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	100
3.2.	EQUIPAMENTO E CONDICIONAMENTO DO CAPILAR	100
3.3.	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS.....	101
3.4.	ORDEM DE MIGRAÇÃO.....	103
3.5.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	103
3.6.	APLICAÇÕES DO MÉTODO.....	106
3.6.1.	<i>Estudo de Estabilidade – Teste de Estresse</i>	106

3.6.2. <i>Análise de Formulação Farmacêutica</i>	107
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
4.1. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	108
4.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	114
4.3. APLICAÇÕES DO MÉTODO	119
4.3.1. <i>Estudo de Estabilidade</i>	119
4.3.2. <i>Análise de Formulação Farmacêutica</i>	122
5. COMENTÁRIOS FINAIS.....	124
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
CONCLUSÕES GERAIS.....	128
ANEXOS	131

INTRODUÇÃO GERAL

---

1. ELETROFORESE CAPILAR

Na eletroforese clássica a migração de espécies carregadas ocorre em meio semi-sólido (gel), sob a influência de campo elétrico. Já a eletroforese capilar (do inglês, *Capillary Electrophoresis* - CE) utiliza tubos capilares, feitos em sua maioria de sílica fundida, revestidos externamente por uma camada de poliimida. A migração dos analitos nestes tubos capilares ocorre devido à diferença de potencial elétrico aplicado nas extremidades do capilar, o qual é preenchido com solução de eletrólitos condutores (ALTRIA, 1996; RIEKKOLA; JONSSON; SMITH, 2004).

Os principais componentes do sistema usado em CE são: fonte de alta tensão, capilar, sistema de detecção, o qual é conectado ao sistema de aquisição de dados e sistema de introdução da amostra. A figura I.1 apresenta um desenho esquemático de um sistema de CE.

Figura I.1. Desenho esquemático dos principais componentes do sistema de eletroforese capilar.

A CE é uma técnica versátil, usada para a separação de uma grande diversidade de compostos, variando de íons inorgânicos a macromoléculas, como as proteínas. Além disso, a eletroforese capilar pode ser empregada na determinação de propriedades físico-químicas, como a constante de dissociação (ISSAQ, 2000).

1.1. Técnicas de Eletromigração em Capilar

Todas as técnicas de eletromigração em capilar podem ser descritas com um conjunto de equações, o qual demonstra uma unidade de fundamentos entre elas, e podem ser realizadas no mesmo equipamento (BIER et al., 1983). Estes fatos podem levar a equívocos na utilização de termos, como o uso do termo eletroforese capilar de forma coletiva a todas as técnicas de eletromigração. Este uso não é recomendado, pois muitas destas técnicas envolvem mecanismos de separação diferente e possuem seletividade característica (RIEKKOLA, JONSSON; SMITH, 2004).

Dentre as diferentes técnicas de eletromigração temos: eletroforese capilar em solução livre (FSCE), cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC), cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC), focalização isoeletrica capilar (CIEF), eletroforese capilar de peneiramento (CSE), isotacoforese capilar (CITP), eletroforese capilar em gel (CGE) e eletrocromatografia capilar (CEC).

A seguir são apresentadas, de forma resumida, as características de algumas técnicas de eletromigração em capilar.

1.1.1. Eletroforese Capilar em Gel (CGE)

A CE em gel utiliza matrizes gelatinosas como meio de separação e é uma poderosa técnica para a separação de macromoléculas, como proteínas e fragmentos de DNA. A CE em gel permite a análise de moléculas com base em seu tamanho, em que a separação é feita em géis físicos ou químicos ou em soluções poliméricas, nos quais o tamanho molecular e concentração determinam a seletividade por efeitos de peneiramento (FEKETE; SCHMITT-KOPPLIN, 2007).

Esta técnica de eletromigração em capilar possui as vantagens da rapidez, alto poder de resolução, reduzido tempo de análise das amostras e possibilidade de automação, quando comparada à tradicional eletroforese em gel de poliacrilamida e a cromatografia por exclusão de tamanho (RIEKKOLA; JONSSON; SMITH, 2004; MIKSIK et al., 2006).

A CGE tem sido aplicada com sucesso para análise de muitas proteínas terapêuticas (NA et al., 2008), incluindo anticorpos monoclonais (mAb) (MA; NASHABEH, 2001; RUSTANDI; WASHABAUGH; WANG, 2008; SALAS-SOLANO; FELTEN, 2008; LACHER et al., 2010) e vacinas baseadas em proteínas (MELLADO et al., 2008).

1.1.2. Focalização Isoelétrica Capilar (CIEF)

A CIEF é uma técnica de eletromigração em capilar em que a separação dos analitos ocorre de acordo com o seu pI, através de um gradiente de pH gerado por anfólitos, mediante a aplicação de um campo elétrico (RIEKKOLA; JONSSON; SMITH, 2004; STAUB, 2011). Após ocorrer a focalização, ou seja, atingir o estado estacionário, a mobilidade das bandas geradas se dá pela aplicação de pressão que empurra a solução inteira através do capilar, com a diferença de potencial elétrico constante aplicado para evitar o alargamento da banda durante a eluição. Uma alternativa é a substituição do ácido no reservatório do anodo por uma base ou a substituição da base do reservatório do cátodo por um ácido, de forma a eluir o gradiente eletroforéticamente. Para permitir uma eficiente focalização e separação deve-se utilizar capilar revestido, de modo a suprimir o fluxo eletrosmótico (do inglês, *Electroosmotic Flow* - EOF) e a adsorção das proteínas na parede do capilar (BUSNEL *et al.*, 2005).

Esta técnica de separação apresenta as vantagens de poder utilizar grandes volumes de amostra aliada a alta resolução e eficiência, devido às estreitas bandas geradas na focalização. A CIEF é uma técnica útil na separação de isoformas de proteínas (LACUNZA; DIEZ-MASA; DE FRUTOS, 2007; FONSLOW *et al.*, 2010).

1.1.3. Eletrocromatografia Capilar (CEC)

A eletrocromatografia capilar é uma técnica de separação que mistura características da eletroforese capilar e de cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High-Performance Liquid Chromatography* - HPLC). Este tipo de eletroforese pode empregar como fase estacionária micro partículas de sílica fundida ou fases monolíticas, usualmente contendo um ligante hidrofóbico que retém os solutos. Da mesma forma que em HPLC, na CEC existe uma fase móvel que é, normalmente, uma mistura de tampões aquosos.

A superfície de sílica possui uma alta densidade de grupos silanóis ionizados, gerando, desta forma, um elevado EOF quando a tensão é aplicada, movendo os analitos com o eletrólito de corrida em direção ao detector. A separação ocorre por interações dos analitos com os ativos imobilizados na superfície das micropartículas combinado com a própria mobilidade eletroforética (RIEKKOLA; JONSSON; SMITH, 2004; FEKETE; SCHMITT-KOPPLIN, 2007).

Como consequência desta forma híbrida de análise, as vantagens da CE (alta eficiência, baixo consumo de solvente, perfil de fluxo radial) são somadas às vantagens da

cromatografia líquida (alta seletividade, separação de compostos neutros) (STAUB et al., 2011). Outra vantagem apresentada pela CEC é a maior compatibilidade da fase móvel com a detecção por espectrometria de massas (KASICKA, 2010). Por outro lado, a CEC mostra-se limitada quanto à capacidade de carga, com baixa robustez e reprodutibilidade (STAUB et al., 2011).

Apesar de possuir diversas vantagens e possuir potencial para a análise de macromoléculas (ZHANG et al., 2000; HSIEH; CHEN; LIU, 2006; MOORE et al., 2010), a CEC possui uma limitação quanto às fases estacionárias, não existindo fases específicas para tais analitos (EL RASSI, 2010).

1.1.4. Cromatografia Capilar Eletrocinética Micelar (MEKC)

Introduzida em 1984 por Terabe, foi um dos grandes avanços da eletromigração em capilar, pois permitiu a separação e análise de compostos neutros e hidrofóbicos por um processo verdadeiramente cromatográfico (TERABE, 2009).

Nesta técnica de eletromigração, tensoativos iônicos, em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC), são adicionados ao eletrólito de corrida, de modo a proporcionar um sistema cromatográfico de duas fases. O eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada eletrosmoticamente sob ação do campo elétrico, enquanto que as micelas representam a fase secundária, neste caso chamada de pseudo-estacionária, a qual é transportada por uma combinação de eletroforese e eletrosmose (TAVARES, 1997). O dodecilsulfato de sódio (SDS) e o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) são os tensoativos mais empregados em MEKC (TERABE, 2009).

Esta técnica de separação depende de particionamento dos analitos entre a solução aquosa e as micelas, os quais compõem o eletrólito de corrida. A interação dos analitos com as micelas ocorre via interações hidrofóbicas (WEINBERGER, 2000; JING; KANETA; IMASAKA, 2005).

Esta técnica tem sido aplicada para a separação de compostos neutros e carregados. No caso de compostos neutros, a separação é baseada apenas no particionamento, enquanto que para compostos carregados, a separação é determinada pelo particionamento bem como pela mobilidade eletroforética (QUIGLEY; DOVICH, 2004; TERABE, 2009).

Analitos que não interagem com as micelas são transportados pela solução aquosa no tempo zero – t_{eo} (velocidade eletrosmótica), já analitos que interagem totalmente com as micelas são transportados com a mesma velocidade das micelas – t_{MC} , enquanto que, analitos

que interagem parcialmente com as micelas são transportados com velocidade entre a eletrosmótica e a velocidade da micela (TAVARES, 1997; WEINBERGER, 2000; TERABE, 2009). Assim, como descrito acima, as velocidades eletrosmótica e micelar criam uma janela temporal de eluição, a qual caracteriza este modo de separação.

Comparada às demais técnicas de eletromigração, poucas aplicações foram encontradas utilizando MEKC para análise de proteínas. Segundo alguns autores, MEKC é adequada para a separação de proteínas, peptídeos e outros biopolímeros que apresentam estruturas ou pI semelhantes (LA *et al.*, 2002; HOLLAND; LEIGH, 2003). Wu *et al.* (2010), desenvolveram método simples, rápido e exato empregando MEKC e uma pré-concentração mediada por pH ácido, em que conseguiram um aumento na sensibilidade de 40,3 vezes na análises de IgG em soro humano.

1.1.5. Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE)

A FSCE, também conhecida como eletroforese capilar de zona, é a técnica de eletromigração mais simples e a mais frequentemente utilizada para a separação de fármacos, proteínas e peptídeos (POURHAGHIGHI; BUSNEL; GIRAULT, 2011). As análises por FSCE são normalmente realizadas empregando tubos capilares preenchidos com eletrólito de corrida. A separação dos analitos ocorre mediante as diferenças entre as respectivas mobilidades eletroforéticas.

Vários autores tem demonstrado o emprego da FSCE para a análise de proteínas. Methuen *et al.* (2007), mostraram a determinação da disialotransferrina, um biomarcador para pancreatite aguda, em amostras de plasma. Neste contexto, Garrido-Medina, Diez-Masa e De Frutos (2011), usaram a FSCE para a análise das diferentes isoformas do antígeno prostático específico (PSA), um biomarcador do câncer de próstata. Alguns revestimentos dinâmicos foram utilizados para reduzir a adsorção das proteínas e, devido à baixa concentração desta proteína no sangue, foi utilizado um detector de fluorescência induzida por laser (do inglês, *Laser Induced fluorescence - LIF*).

A FSCE é frequentemente aplicada para a análise de fármacos e biofármacos, como exemplificado por Catai *et al.* (2007) na análise do hormônio do crescimento recombinante (rhGH), empregando capilares revestidos com polibreno (PB) e poli-vinil sulfonato (PVS) e detecção por espectrometria de massas; e por Staub *et al.* (2011), que identificaram e quantificaram a insulina por FSCE acoplado a MS/TOF.

1.1.5.1. Fundamentos Teóricos da Migração Eletroforética em Capilar

A FSCE é uma técnica de separação que se baseia na diferença de migração de compostos carregados, de acordo com a sua razão carga/tamanho, em um tubo capilar semiconductor, geralmente confeccionado de sílica, pelo qual os íons positivos (cátions) migram em direção ao eletrodo carregado negativamente (cátodo) e íons negativos (ânions) migram em direção ao eletrodo positivo (ânodo), sob influência de um campo elétrico aplicado (TAVARES, 1997; MORZUNOVA, 2006; AHUJA, 2008). A detecção é, geralmente, realizada na extremidade oposta à injeção das amostras e a análise é registrada na forma de eletroferograma (TAVARES, 1997; LARA-QUINTANAR et al., 2007).

O uso de tubos capilares (contendo apenas o tampão de análise) em eletroforese oferece muitas vantagens, como a alta resistência elétrica do tubo capilar, o que permite o trabalho em campos elétricos mais altos (até 500 V cm^{-1}); eficiente dissipação de calor e tempo reduzido de separação, devido ao alto campo elétrico aplicado (MORZUNOVA, 2006).

Na superfície da parede interna do tubo capilar (sem modificação superficial) existe a presença de grupamentos silanóis ácidos, os quais quando em contato com soluções eletrolíticas com valores de pH superiores a 3 apresentam-se carregados negativamente (Si-O^-) (MORZUNOVA, 2006). Como consequência, contra-íons do eletrólito são atraídos para a parede do capilar carregada negativamente, enquanto co-íons do eletrólito serão repelidos. Na interface capilar-solução eletrolítica os contra-íons da solução tendem a absorver na parede do capilar por atrações eletrostáticas para equilibrar as cargas de superfície formando uma primeira camada (denominada camada estática ou fixa). Como consequência do excesso de cargas negativas, uma segunda camada de cátions é formada (denominada camada difusa ou móvel), o que dá origem ao modelo de dupla camada elétrica (figura I.2).

A diferença de potencial criada pelo desbalanceamento elétrico na região de cisalhamento entre as duas camadas é denominado potencial zeta (ζ) (WEINBERGER, 2000; MORZUNOVA, 2006). Quando uma diferença de potencial externa é aplicada nas extremidades do capilar, é gerado um campo elétrico, assim, os cátions da camada difusa da dupla camada elétrica são atraídos para o cátodo. O movimento de migração de cátions hidratados da camada móvel em direção ao cátodo arrastando todo o volume da solução causa um fluxo em rede da solução ao longo do capilar. Este movimento de massa da solução sob ação do campo elétrico aplicado é chamado de fluxo eletrosmótico (EOF) (TAGLIARO; TURRINA; SMITH, 1996; WEINBERGER, 2000; MORZUNOVA, 2006).

Figura I.2. Representação do modelo de dupla camada. Adaptado de Jimidar (2008).

A extensão do fluxo está relacionada à carga no capilar, à viscosidade e à constante dielétrica do meio, conforme a equação I.1:

$$\mu_{eo} = -\frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \quad (\text{I.1})$$

em que μ_{eo} é a mobilidade eletrosmótica, ε é a constante dielétrica do meio, ζ é o potencial zeta (potencial no plano de cisalhamento que se encontra na camada difusa e está associado ao fenômeno da eletrosmose) e η é a viscosidade do meio.

Em FSCE a separação é realizada no eletrólito de corrida e é baseada na diferença entre as taxas relativas de migração eletroforéticas dos componentes da amostra. A velocidade de um íon (v_i) é diretamente proporcional à sua mobilidade eletroforética (μ_{ep}) e ao campo elétrico (E) aplicado, conforme mostrado na equação I.2:

$$v_i = \mu_{ep} \cdot E \quad (\text{I.2})$$

em que μ_{ep} é descrita pela equação I.3:

$$\mu_{ep} = \frac{ze}{6\pi\eta r} \quad (\text{I.3})$$

em que z é o número de cargas elementares do íon, e é a carga elementar, r o raio hidratado e η a viscosidade do meio.

Observando a equação acima, fica claro que a dimensão molecular e a carga são os principais fatores que influenciam a mobilidade iônica. Para ácidos e bases fracas, a carga depende dos valores individuais de pKa e do pH do eletrólito de corrida (TAGLIARO; TURRINA; SMITH, 1996; WEINBERGER, 2000; MORZUNOVA, 2006).

Segundo Tavares (1997), para soluções de eletrólitos compostos de ácido e bases fracas, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio, a molécula não ionizada (mobilidade zero) e a base ou ácido conjugado, cada qual com valor particular de mobilidade. A mobilidade eletroforética efetiva (μ_{ef}) de um analito é dada pela somatória vetorial das mobilidades eletroforéticas (μ_j) de todas as “n” espécies relacionadas entre si por equilíbrios químicos, multiplicadas pela distribuição destas espécies (α_j), como mostrado na equação I.4:

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \mu_j \quad (I.4)$$

A equação acima mostra que a mobilidade efetiva depende diretamente do grau de dissociação do composto que se apresenta em equilíbrio ácido-base em um dado valor de pH.

A equação I.5 descreve o tempo de migração em CE:

$$t_i = \frac{L_{ef} \cdot L_{tot}}{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \cdot V} \quad (I.5)$$

em que t_i é o tempo de migração, V é a diferença de potencial aplicada, L_{tot} é o comprimento total do capilar e L_{ef} é a distância do ponto de injeção à posição do detector.

Nota-se que o tempo de migração total de um analito está relacionado à μ_{ep} e a μ_{eo} , sendo o resultado da soma vetorial destes parâmetros a mobilidade aparente (μ_A) do analito. Conforme a equação I.5, todos os analitos migrarão na mesma direção caso a velocidade do EOF seja maior em magnitude e oposta em direção a todos os ânions no tampão. Sendo assim, ambos, ânions e cátions, poderão ser separados na mesma corrida, visto que, os cátions serão atraídos em direção ao cátodo e suas velocidades serão aumentadas pelo EOF e os ânions, apesar de eletroforicamente atraídos pelo ânodo, serão arrastados em direção ao cátodo pelo EOF (figura I.3) (LI, 1992).

Figura I.4. Perfil de fluxo: a) hidrodinâmico (sistema dirigido por pressão) e b) eletrosmótico (sistema dirigido eletricamente). Adaptado de Jimidar (2008).

Dentre as vantagens oferecidas pela CE destacam-se a simplicidade, análises rápidas, automação, baixo consumo de solvente e baixo custo dos tubos capilares, quando comparada a HPLC. Além destas, a CE oferece uma alta eficiência e um alto poder de resolução, utilizando pequena quantidade de amostra (PICO; RODRIGUEZ; MANES, 2003; ANASTOS; BARNETT; LEWIS, 2005; AHUJA, 2008; SIMPSON JR; QUIRINO; TERABE, 2008).

As maiores desvantagens da CE são o limite de detecção relativamente alto, como consequência do limitado volume de amostra analisado e do reduzido caminho óptico para a detecção (quando empregada detecção por absorção no UV), a qual é realizada diretamente no capilar, e menor precisão da injeção quando comparada aos métodos cromatográficos (VAN EECKHAUT; MICHOTTE, 2006; GUBITZ; SCHMID, 2008). Para superar tais desvantagens, diferentes estratégias tem sido utilizadas, como o emprego de células de detecção em forma de bolha (TSUDA; SWEEDLER; ZARE, 1990; LIU; OTSUKA; TERABE, 2002) ou em forma de Z (MORING et al., 1993; SIMPSON JR; QUIRINO; TERABE, 2008), as quais podem proporcionar melhorias significativas no sinal, porém estas estratégias podem, também, induzir perda de resolução (SENTELLAS; PUIGNOU; GALCERAN, 2002; LIN; KANETA, 2004).

Uma segunda estratégia é o uso de detectores de alta sensibilidade como o LIF, o de quimiluminescência ou os detectores eletroquímicos (SANTOS; TAVARES; RUBIM, 2000; CATAI et al., 2007; SIMPSON JR; QUIRINO; TERABE, 2008; TSENG et al., 2009). Os

detectores LIF e quimiluminescência podem aumentar a sensibilidade em mais de 1000 vezes, quando comparado com os detectores convencionais de absorção e todos os três detectores citados anteriormente podem ser usados com quantidades mínimas de volumes de injeção, na ordem de picolitros (SIMPSON JR; QUIRINO; TERABE, 2008).

Outra maneira para melhorar a sensibilidade é fazer a pré-concentração da amostra após a injeção (concentração *on-line*), em que ocorre um empilhamento (*stacking*) do analito. O *stacking* ocorre após a injeção, quando são formadas duas regiões distintas no capilar, a região da amostra (menor condutividade - amostra diluída em água ou em eletrólito diluído) e a região do eletrólito (maior condutividade). Quando a diferença de potencial é aplicada, a força do campo elétrico (que é inversamente proporcional à concentração da solução) na região da amostra é maior, e as espécies carregadas nesta região migram em direção à região do eletrólito com maior velocidade. Então, quando estas espécies atingem a região do eletrólito, onde a força do campo elétrico é menor, elas são desaceleradas o que causa um acúmulo ou “empilhamento” dos íons da amostra (CHIEN; BURGI, 1991).

As técnicas de pré-concentração mais utilizadas são *field amplified stacking* (BESSONOVA; KARTSOVA; SHMUKOV, 2007; WANG; YANG; CHENG, 2007), *large-volume sample* (HE; LEE, 1999; BAILON-PEREZ et al., 2007), *dynamic pH junction* (BRITZ-MCKIBBIN; BEBAULT; CHEN, 2000; JURCIC; NESBITT; YEUNG, 2006; IMAMI et al., 2007), *transient isotachophoresis* (FUKUSHI et al., 2000; HUANG et al., 2005) e *pH-mediated stacking* (WEISS; SAUNDERS; LUNTE, 2001; HOQUE; AMETT; LUNTE, 2005). Cada uma destas técnicas depende de um mecanismo de focalização diferente, baseado na diferença das propriedades eletrolíticas do analito entre a zona da amostra e a zona da solução de separação, tais como: força iônica, pH do meio e concentração de aditivos (ZHANG; SUN, 2005; MA et al., 2007; WU et al., 2009).

1.2. Análise enantiosseletiva por eletroforese capilar

A separação e análise de compostos quirais tem chamado a atenção de muitos pesquisadores, pois a presença de centro ou centros quirais em uma estrutura química leva a formação de compostos com arranjo espacial diferente (enantiômeros) sendo que, muitas vezes, os enantiômeros apresentam propriedades farmacológica e biológica diferentes (JUVANCZ et al., 2008; FANALI, 2009; CASLAVSKA; THORMANN, 2011).

1.2.1. Fármacos Quirais

A química quiral foi descoberta, pela primeira vez, por Louis Pasteur em 1848, quando ele conseguiu separar os dois isômeros do tartarato de amônio e sódio. No entanto, com o passar do tempo, descobriu-se que o fenômeno da quiralidade desempenha um papel fundamental não apenas na vida de plantas e animais, mas também na indústria farmacêutica, indústrias de produtos químicos e agrícolas, entre outras (NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006).

Para que uma molécula seja considerada quiral, é necessário que esta tenha pelo menos um átomo de carbono assimétrico, ou seja, um átomo de carbono com quatro substituintes diferentes. A diferente disposição espacial destes substituintes ligados ao carbono assimétrico (também denominado centro quiral) leva à formação de dois isômeros que serão imagens especulares um do outro, porém não sobreponíveis. Esses isômeros são denominados enantiômeros e irão possuir as mesmas propriedades físico-químicas, excetuando-se o desvio da luz plano-polarizada. O carbono não é o único átomo que pode atuar como um centro assimétrico. Enxofre, fósforo e nitrogênio também podem formar moléculas quirais (NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006).

Até meados de 2006 cerca de 60 % dos medicamentos disponibilizados pelas indústrias farmacêuticas eram quirais, dos quais, aproximadamente, 90 % eram comercializados na forma de mistura racêmica, ou seja, uma mistura equimolar dos dois enantiômeros (NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006). Apesar de terem a mesma estrutura química, a maioria dos enantiômeros de fármacos apresenta diferenças significativas nas atividades farmacológica e toxicológica, na farmacocinética e metabolismo (CASLAVSKA; THORMANN, 2011).

Estas diferenças podem ser explicadas pela natureza quiral de aminoácidos, açúcares, peptídeos, proteínas e polissacarídeos, que compõem o sítio de ligação fármaco-receptor. Sendo estes sítios de ligação sensíveis a estereoquímica, irão interagir de maneira diferente com cada enantiômero, levando a diferentes respostas quando as atividades dos enantiômeros são comparadas (NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006).

Como já discutido anteriormente, os enantiômeros de uma mistura racêmica podem diferir nas ações no sistema biológico de diferentes maneiras. Na primeira, apenas um dos enantiômeros apresenta atividade e o outro permanece inativo ou menos ativo, tóxico ou pode exercer outras propriedades farmacológicas, desejadas ou indesejadas. Uma segunda maneira é destinada a fármacos, em que os dois enantiômeros podem apresentar atividade

farmacológica qualitativa e quantitativa similares. Em um último caso, estão os fármacos que possuem um enantiômero com atividade, e o outro enantiômero só apresentará atividade se for convertido, no organismo por inversão quiral, ao primeiro enantiômero, que possui atividade (NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006).

Dentre os fármacos quirais que possuem enantiômeros com diferentes interações com os sítios de ligação, levando a diferentes efeitos, encontram-se alguns de ação cardiovascular, amplamente utilizados para o tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca, arritmias e outras doenças. Como exemplo podem ser citados os bloqueadores β -adrenérgicos, como o propranolol, em que as propriedades farmacológicas de bloqueio reside no (S)-(-)-propranolol, enquanto que o (R)-(+)-propranolol possui apenas o efeito de estabilizador da membrana (STOSCHITZKY; LINDNER; KIEWSKI, 1995), e os antagonistas de canais de cálcio, como o verapamil, sendo a potência farmacológica do (S)-(-)-verapamil 10 a 20 vezes maior do que a do (R)-(+)-verapamil (PAGEL et al., 1998; WILLIAMS; WAINER, 2002).

Mediante as diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica apresentada pelos enantiômeros, o reconhecimento e a possibilidade do desenvolvimento destes de forma isolada passaram a ter grande abordagem e importância. Sendo assim, os órgãos regulatórios, como o FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos, passaram a requerer dos fabricantes uma identificação e caracterização de cada enantiômero individualmente e na mistura racêmica do novo produto, antes de seu lançamento no mercado (BONATO; JABOR; DE GAITANI, 2005).

Para a realização destes estudos, técnicas de separação e quantificação estereosseletiva em matrizes biológicas e ensaios analíticos para detecção de pureza enantiomérica são requeridos (CASLAVSKA; THORMANN, 2011). A CE tem se mostrado uma ferramenta importante na separação quiral, devido a sua alta eficiência, baixo custo operacional e a grande variedade de seletos quirais, os quais podem ser utilizados em misturas e em diferentes concentrações (CHEN et al., 2004; FANALI, 2009).

1.2.2. Fundamentos da Separação Enantiomérica em CE

Dentre as técnicas analíticas utilizadas para a análise de compostos quirais tem-se a HPLC, a cromatografia em fase gasosa (GC) e a CE. A eletroforese capilar é uma técnica de separação moderna que vem sendo utilizada pela maioria dos pesquisadores na separação quiral, pois fornece análises rápidas, com alta eficiência e resolução, baixo custo, além de

uma versatilidade em relação aos seletores quirais (BONATO; JABOR; DE GAITANI, 2005; JUVANCZ et al., 2008).

A separação dos enantiômeros por CE pode ser realizada de dois modos distintos, o indireto e o direto. No modo indireto a separação é baseada na reação química dos enantiômeros com o seletor quiral. Esta reação leva à formação de diastereoisômeros estáveis que possuem propriedades físico-químicas diferentes, permitindo assim a separação destes por CE. No modo direto, o mais utilizado atualmente, a separação é baseada na adição do seletor quiral ao eletrólito de corrida. Desta forma, os enantiômeros podem interagir com o seletor quiral formando complexos diastereoisoméricos temporários ou transitórios. A diferença de estabilidade dos complexos formados entre os enantiômeros e o seletor quiral ocasiona diferentes mobilidades tempo-dependentes e proporciona a separação (FANALI; ATURKI; DESIDERIO, 1998; JUVANCZ et al., 2008; DE OLIVEIRA, 2011).

O modo de separação direto difere da separação eletroforética convencional, pois é baseada não somente no fenômeno eletroforético, visto que os enantiômeros não são separados em ambiente aquiral. Para que se alcance a separação quiral é necessária a formação de complexos diastereoisoméricos temporários entre o analito e o seletor quiral. Esta formação de complexos temporários é regida por processos de adsorção/partição, fenômenos verdadeiramente cromatográficos (JUVANCZ et al., 2008; CHANKVETADZE, 2009; DE OLIVEIRA, 2011).

Partindo do fato de que o seletor quiral interage de forma estereosseletiva com os analitos, este equilíbrio secundário pode levar a diferenças na mobilidade entre os enantiômeros do analito quiral. Esta diferença pode ser calculada pela equação I.6 (CHANKVETADZE, 2009):

$$\Delta\mu = \mu_R - \mu_S = \frac{\mu_f + \mu_{cR}K_R[C]}{1+K_R[C]} - \frac{\mu_f + \mu_{cS}K_S[C]}{1+K_S[C]} \quad (\text{I.6})$$

em que μ_R é a mobilidade apresentada pelo enantiômero (R)- e μ_S é a mobilidades apresentada pelo enantiômeros (S)-; μ_f é a mobilidade dos enantiômeros na forma livre, não complexados; K_R e K_S são as constantes de equilíbrio do complexo entre os enantiômeros (R)- e (S)- e o seletor quiral, respectivamente; μ_{cR} e μ_{cS} são as mobilidades dos complexos diastereoisoméricos temporários formados entre seletor quiral e o enantiômeros; e $[C]$ é a concentração do seletor quiral.

Considerando que a mobilidade de ambos enantiômeros complexados não diferem significativamente ($\mu_{cR} = \mu_{cS} = \mu_c$), a enantiosseparação pode ser baseada na diferença das constantes de complexação ($K_R \neq K_S$), conforme mostrado na equação I.7:

$$\Delta\mu = \mu_R - \mu_S = \frac{(\mu_f - \mu_c)(K_S - K_R)[C]}{1 + (K_R + K_S)[C] + K_R K_S [C]^2} \quad (\text{I.7})$$

Segundo a equação acima, outro fator é necessário para a separação quiral, a diferença entre as mobilidades dos enantiômeros livres e complexados ($\mu_f - \mu_c \neq 0$).

Alternativamente, a separação enantiomérica pode ser realizada de acordo com a diferença entre as mobilidades dos complexos diastereoisoméricos ($\mu_{cR} \neq \mu_{cS}$), assumindo neste caso a igualdade das constantes de complexação ($K_R = K_S = K$). Deste modo, tem-se a equação I.8:

$$\Delta\mu = \mu_R - \mu_S = \frac{K[C](\mu_{cR} - \mu_{cS})}{1 + K[C]} \quad (\text{I.8})$$

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

1.2.3. Seletores Quirais

Diversos são os seletores quirais que podem ser empregados em CE para análises enantiosseletivas. Dentre eles tem-se éter coroa, sais biliares, proteínas, antibióticos macrocíclicos, polissacarídeos e reagentes de par iônico. Um bom seletor quiral deve apresentar algumas características, como: formar complexos diastereoisoméricos transitórios com diferentes estabilidades com cada enantiômero; deve ser solúvel e quimicamente estável no eletrólito; não deve interferir com a detecção e deve exibir rápida cinética de complexação (BLANCO; VALVERDE, 2003). Ao longo das últimas décadas, as ciclodextrinas (CDs) vêm se destacando como um poderoso seletor para se alcançar a separação quiral (BONATO; JABOR; DE GAITANI, 2005; VENTURINI et al., 2008; FANALI, 2009).

As CDs são oligossacarídeos formados pela ação enzimática de glicosiltransferases (CGTases) sobre o amido. As CDs mais importantes que apresentam ocorrência natural são as α -, β - e γ -CDs, que possuem 6, 7 e 8 unidades de (+)-(D)-glicopiranosose unidas por ligações $\alpha(1-4)$, respectivamente (Figura I.5). Elas apresentam um formato de cone truncado, em que a cavidade é hidrofóbica e a parte externa hidrofílica, resultado da presença de grupos hidroxilas (BONATO; JABOR; DE GAITANI, 2005; MIKUS; MARAKOVA, 2009).

O mecanismo básico de separação quiral, mais aceito atualmente, usando CDs é baseado na formação de complexo de inclusão entre a cavidade da CD (hidrofóbica) e o analito, sendo que a parte externa (hidrofílica) também pode participar da separação, auxiliando na formação e estabilização do complexo (FANALI; ATURKI; DESIDERIO, 1998; MIKUS; MARAKOVA, 2009).

A dimensão da cavidade da CD e o tamanho/formato dos enantiômeros devem ser cuidadosamente observados, a fim de saber quais CDs devem ser consideradas para a resolução enantiomérica dos analitos estudados. Analitos com um anel aromático podem formar complexos de inclusão com a α -CD, devido ao menor tamanho da cavidade, para analitos com dois anéis, a cavidade da β -CD proporciona um melhor encaixe, enquanto que as γ -CD são mais adequadas para a resolução de analitos com três anéis aromáticos (FANALI; ATURKI; DESIDERIO, 1998).

Figura I.5. Estruturas da α -CD, β -CD e γ -CD. Adaptado de Venturini et al.(2008).

Mesmo apresentando muitas aplicações, as CDs nativas estão sendo substituídas ou utilizadas em associações com CDs modificadas. Os grupos hidroxilas presentes na borda da CD podem ser facilmente modificados por reações químicas com vários grupos funcionais criando, assim, uma grande variedade de CDs derivatizadas, as quais apresentam uma maior capacidade de formar complexos, maior solubilidade e maior seletividade (MIKUS; MARAKOVA, 2009).

Com a possibilidade de modificação das CDs, alguns grupos de CD derivadas foram criados: as CDs neutras; as CDs carregadas (negativa ou positivamente); CDs anfotéricas e CDs polimerizadas.

As CDs neutras (exemplo: substituição dos grupos hidroxilas por grupos alquila ou hidroxialquila) podem oferecer uma maior flexibilidade da cavidade, levando a melhor acomodação dos analitos e aumentando a estabilidade do complexo de inclusão formado (BLANCO; VALVERDE, 2003; MIKUS; MARAKOVA, 2009). Isso pode melhorar a solubilidade de CDs e seus complexos. Dentre as CDs neutras substituídas a hidroxipropil beta CD (HP- β -CD) é a mais comumente utilizada.

Devido à dificuldade na separação de compostos neutros utilizando as CDs neutras, foram sintetizadas CDs com grupos carregados anionicamente, como a carboximetil- β -CD (CM- β -CD), CD- β -sulfatada (S- β -CD) (quando utilizada em solução com valor de pH maior que 5,0) (FANALI; ATURKI; DESIDERIO, 1998), sulfobutiléter- β -CD (SBE- β -CD) e catiônicas, como a trimetilamônio- β -CD, entre outras.

Dentre as CDs carboxiladas, a CM- β -CD (CHEN et al., 2004; MANDRIOLI et al., 2004; Van Eeckhaut, Detaevernier *et al.*, 2004) e carboxietil- β -CD (CE- β -CD) (MIKUS; VALASKOVA; HAVRANEK, 2005) estão entre as mais utilizadas. De Santana, Lanchote e Bonato (2008), empregaram a CM- β -CD na análise enantiosseletiva da mirtazapina e seus metabólitos, ambos quirais, em amostras de urina, enquanto que Mandrioli et al. (2004), realizaram a separação destes mesmos compostos em plasma, também empregando a CM- β -CD.

No caso das derivadas sulfatadas, como a S- β -CD e a SBE- β -CD, são principalmente empregadas na separação de analitos básicos ou neutros (ZHANG et al., 2004a; ZHANG et al., 2004b; ZHOU et al., 2004).

1.3. Análise de proteínas por eletroforese capilar

A aplicação da CE para pesquisa na área de proteômica tem aumentado nos últimos anos (RAMAUTAR et al., 2012; KURODA et al., 2013). Uma vantagem da CE sobre os métodos tradicionais (eletroforese em gel uni e bidimensional) é que esta oferece a possibilidade de concentrar amostras diluídas na coluna capilar antes da separação. Este é um ponto bastante atraente para proteômica, visto que elevada sensibilidade é essencial. Não obstante a este fato, a integração entre a preparação da amostra, separação e detecção torna-se viável, o que reduz a manipulação no processamento da amostra, reduzindo assim a perda de analito (MORITA; SAWADA, 1993; MANABE, 2000; EL RASSI, 2010; STAUB et al., 2011).

Apesar de possuir muitas vantagens, a CE apresenta alguns inconvenientes que ainda precisam ser resolvidos, a fim de torna-la mais atraente as aplicações bioanalíticas reais. Uma das desvantagens é o pequeno volume de amostra injetada (1-10 nL). Isto, juntamente com o reduzido comprimento do caminho óptico para a detecção (quando utilizado com detector UV/Vis), conduz a elevados limites de detecção.

Para proteínas, a análise por CE é, geralmente, limitada à faixa micromolar, quando se usa detectores de absorção de UV (ASTORGA-WELLS; SWERDLOW, 2003; STEEL et al., 2003; PERLATTI; CARRILHO; AGUIAR, 2012). Além do elevado limite de detecção, análises de proteínas por CE mostram-se desafiadoras pela indesejável adsorção do analito sobre a superfície da parede do capilar. Interações não específicas (como, van der Waals e eletrostática) entre proteínas e a superfície podem existir. A superfície de sílica fundida (material mais comumente usado para em CE) oferece sítios de interação, o que impõe dificuldades quanto à análise de proteínas (SCHURE; LENHOFF, 1993). Estas interações podem alterar o potencial zeta ao longo do capilar, conduzindo a um alargamento de pico e dificuldades de reprodução dos tempos de migração. A adsorção de proteínas e peptídeos é influenciada por diversos fatores como o pH e a composição do eletrólito de corrida, o tipo de proteína, a temperatura de separação e a natureza da superfície do capilar (STUTZ, 2009).

Diversas estratégias tem sido propostas na tentativa de minimizar a adsorção dos analitos na parede do capilar. Dentre as estratégias, as mais simples são a escolha adequada do eletrólito de corrida, eletrólito de corrida em baixos valores de pH e elevada força iônica e a adição de modificadores orgânicos (STUTZ, 2009; KASICKA, 2010). Outra estratégia é trabalhar com valores extremos de pH, em que os grupos silanóis estão ionizados (Si-O^-) ou neutros (Si-OH). O sucesso desta abordagem foi demonstrado por Lauer e Mcmanigill (1986).

Outra maneira de minimizar os efeitos da adsorção é o uso de capilares revestidos, os quais ajudam a suprimir os efeitos indesejáveis da adsorção e melhoram a resolução dos analitos (DOLNIK, 2008; EL RASSI, 2010).

1.3.1. Biofármacos

Desde meados dos anos 70 grandes avanços na área de fisiologia, farmacologia, enzimologia e biologia celular e molecular têm levado a enormes progressos na habilidade de entender a bioquímica e as rotas moleculares de muitas doenças, permitindo, assim, a descoberta de novos fármacos e biofármacos (PAVLOU; BELSEY, 2005).

Biofármacos, tais como anticorpos monoclonais, são moléculas complexas produzidas ou derivadas de organismos vivos usando tecnologia de DNA recombinante, sendo que os produtos desta biotecnologia são tipicamente proteínas (BERGEMANN et al., 2007; HORIKAWA; TSUBOUCHI; KAWAKAMI, 2009). Proteínas e peptídeos têm sido considerados como substâncias terapêuticas no combate a doenças humanas desde a introdução da insulina, hormônios da tireóide e fator de coagulação VIII, beneficiando muitas pessoas no mundo, principalmente, no tratamento de doenças crônicas (DAL MONTE; ROUAN; BAM, 2002; LU; YANG; SEGA, 2006).

Devido à introdução de eficientes técnicas biotecnológicas de produção, uma ampla variedade de proteínas recombinantes (biofármacos) tem se tornado parte integrante do desenvolvimento farmacêutico e, assim, uma maior quantidade destes estão disponíveis no mercado mundial (DAL MONTE; ROUAN; BAM, 2002; CATAI et al., 2007). Atualmente, mais de 130 biofármacos estão disponíveis no mercado mundial, dos quais 95 são produzidos por tecnologia de DNA recombinante, e mais de 400 novos biofármacos estão em desenvolvimento no mundo (NOWICKI, 2007; RADER, 2008; HORIKAWA; TSUBOUCHI; KAWAKAMI, 2009).

Para facilitar os estudos dos biofármacos, Leader, Baca e Golan (2008) propuseram uma classificação destes baseada na ação farmacológica, assim, quatro grupos foram criados:

- Grupo I – Proteínas terapêuticas com atividade enzimática e regulatória. (Insulina, somatropina, eritropoetina e interferons);
- Grupo II – Proteínas terapêuticas alvo. (Anticorpos monoclonais);
- Grupo III – Vacinas de Proteína. (Superfície de antígeno da Hepatite B, vacina de HPV);

- Grupo IV – Proteínas para diagnóstico clínico – biomarcadores. (Hormônio indutor do hormônio de crescimento, glucagon).

Biofármacos são diferentes de fármacos baseados em síntese química, em que as diferenças inerentes entre estas duas classes incluem o produto e a fonte dos princípios ativos, identidade, estrutura, composição, métodos de fabricação e equipamentos, formulação, manuseio, regulamentação e comercialização (SCHELLEKENS, 2004; BERGEMANN et al., 2007; MELLSTEDT; NIEDERWIESER; LUDWIG, 2008).

Os biofármacos apresentam algumas vantagens sobre fármacos baseados em síntese química, como funções altamente específicas e complexas; devido a sua alta especificidade, uma menor quantidade é requerida para provocar o efeito desejado; por serem produtos endógenos o tempo de desenvolvimento clínico e aprovação pelos órgãos reguladores é menor (LEADER; BACA; GOLAN, 2008).

Muitos biofármacos com atividade *in vitro*, frequentemente, falham em produzir suficiente efeito quando aplicado *in vivo*, muitas vezes devido à baixa biodisponibilidade oral, baixa estabilidade, baixa meia-vida plasmática, a pobre permeação através das membranas biológicas (HERMELING et al., 2004; LU; YANG; SEGA, 2006; HORIKAWA; TSUBOUCHI; KAWAKAMI, 2009). Paralelamente, outro problema na utilização de biofármacos é a imunogenicidade, que provoca indesejáveis respostas imunes no paciente. Este fato impede a administração repetida do biofármaco. Dentre os fatores que contribuem para a imunogenicidade incluem proteínas de origem não-humana, presença de impurezas ou agregados, alterações na estrutura nativa e o estado imune do paciente (HERMELING et al., 2004; LU; YANG; SEGA, 2006).

Os processos de produção devem garantir a qualidade e estabilidade do produto em acordo com as autoridades regulatórias. Os parâmetros de qualidade como pureza, identificação, eficácia, segurança e estabilidade devem ser monitorados lote a lote antes de liberar o produto para uso em humanos (BERGEMANN et al., 2007).

O crescente desenvolvimento de biofármacos aumenta a demanda por métodos apropriados para análise que permita não somente a separação e quantificação de impurezas e possíveis produtos de degradação, como também a identificação e a caracterização físico-química (DAL MONTE; ROUAN; BAM, 2002; CATAI et al., 2007). Nesta área a CE vem ganhando destaque devido às diversas vantagens já apresentadas, tendo diversas aplicações na análise de biofármacos, como demonstrado pelos métodos aprovados pela Farmacopeia Europeia na análise da eritropoetina e da somatropina (hormônio do crescimento).

A utilização bem sucedida da CE resultou em crescimento da mesma como ferramenta para o setor de pesquisa e desenvolvimento, de controle de qualidade de fármacos e biofármacos, e para a caracterização de proteínas e biomoléculas terapêuticas. Não obstante a este fato, o sucesso da utilização da CE na análise de biofármacos por orientação do *International Conference on Harmonization* (ICH) conferiu à técnica uma maior importância, sendo que muitas empresas passaram a adotá-la para a determinação da pureza do produto, da identidade e consistência necessária para a liberação de produtos de base proteica (GUO et al., 2008).

1.3.2. Biomarcadores

Inicialmente, biomarcador (marcador biológico) foi descrito como uma substância usada como um indicador de estado biológico. Atualmente refere-se a um termo do *Medical Subject Heading*, em que parâmetros biológicos (concentração de enzima específica, concentração de hormônio específico, distribuição fenotípica de gene específico em uma população e presença de substâncias biológicas) são mensuráveis e quantificáveis, os quais servem como índices de saúde e para avaliação relacionada à fisiologia tais como riscos de doenças, distúrbios psiquiátricos, diagnósticos de doenças, processos metabólicos, abuso de substâncias, processos patogênicos, entre outros (ADKINS et al., 2002; ILYIN; BELKOWSKI; PLATA-SALAMAN, 2004; OMENN, 2006; ZHANG et al., 2009).

Biomarcadores são moléculas produzidas *in vivo*, as quais apresentam associação com condições fisiológicas específicas (CALLESEN et al., 2009), por exemplo, proteínas que sofrem mudança em sua concentração ou no estado de associação, de acordo com o processo biológico ou doenças (LUQUE-GARCIA; NEUBERT, 2007). Esta associação, entre o biomarcador e o processo biológico, possibilita diagnóstico precoce e preciso de doenças em estágios intermediários, deste modo, levando a resultados terapêuticos mais favoráveis, a melhor estratificação dos pacientes e seleção dos mesmos para as novas intervenções de tratamento. Por isso, a procura por um biomarcador ideal vem sendo destacado por vários autores (LEVY et al., 2003; MARSHALL et al., 2003; SCHIESS; WOLLSCHIED; AEBERSOLD, 2009).

Uma ampla variedade de materiais biológicos pode ser usada para prospecção de biomarcadores, incluindo lisado de células, homogenatos de tecidos e fluidos do corpo

humano, tais como sangue, urina, fluido cérebro-espinhal (HU; LOO; WONG, 2006; CALLESEN et al., 2009; TUMANI et al., 2009).

Muitos esforços são feitos a partir do material biológico selecionado para maximizar a detecção de diferenças significantes nas proteínas, enquanto tenta-se minimizar a quantidade de amostras requeridas para análises (RIFAI; GILLETTE; CARR, 2006). Entretanto, a análise de uma matriz complexa (fluido biológico, tal como o sangue) é um desafio, pois esta contém um grande número de proteínas que podem ser modificadas em uma variedade de formas (ex.: glicosiladas). Esta glicosilação pode, substancialmente, modificar a estrutura e função da proteína pela influência estérica, envolvendo interações intra e intermolecular (MARTH; GREWAL, 2008).

A análise e quantificação de biomarcadores têm gerado vários exemplos individuais de que estes podem ser usados como indicadores pato-fisiológicos de doenças: o precursor-B da leucemia linfoblástica aguda tem sua concentração elevada, antes do tratamento e reduzida durante e depois de finalizada a terapia; o antígeno próstata-específico (PSA) é outro exemplo, em que a determinação de sua presença em elevada concentração possibilita a detecção do câncer de próstata em estágio mais brando da doença (ILYIN; BELKOWSKI; PLATA-SALAMAN, 2004; SCHIES; WOLLSCHIED; AEBERSOLD, 2009; GARRIDO-MEDINA; DIEZ-MASA; DE FRUTOS, 2011).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, J. N. et al. Toward a human blood serum proteome - Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 12, p. 947-955, Dec 2002. ISSN 1535-9476. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185314000004 >.

AHUJA, S. Overview of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. In: AHUJA, S. A. J., M.I. (Ed.). **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**. London, England: Elsevier, v.9, 2008. cap. 1, p.8.

ALTRIA, K. D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications**. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc., 1996. 349.

ANASTOS, N.; BARNETT, N. W.; LEWIS, S. W. Capillary electrophoresis for forensic drug analysis: A review. **Talanta**, v. 67, n. 2, p. 269-279, Aug 2005. ISSN 0039-9140. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231521300003 >.

ASTORGA-WELLS, J.; SWERDLOW, H. Fluidic preconcentrator device for capillary electrophoresis of proteins. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 19, p. 5207-5212, Oct 2003. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185717700038 >.

BAILON-PEREZ, M. I. et al. Large-volume sample stacking for the analysis of seven beta-lactam antibiotics in milk samples of different origins by CZE. **Electrophoresis**, v. 28, n. 22, p. 4082-4090, Nov 2007. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251363800007 >.

BERGEMANN, K. et al. Production and downstream processing. In: DÜBEL, S. (Ed.). **Handbook of Therapeutic Antibodies**. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2007. cap. 9, p.40. ISBN Print ISBN: 9783527314539.

BESSONOVA, E. A.; KARTSOVA, L. A.; SHMUKOV, A. U. Electrophoretic determination of albumin in urine using on-line concentration techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, n. 1-2, p. 332-338, May 2007. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247049200044 >.

BIER, M. et al. Electrophoresis - Mathematical-Modeling and Computer-Simulation. **Science**, v. 219, n. 4590, p. 1281-1287, 1983. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1983QE92200010 >.

BLANCO, M.; VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 428-439, Jul-Aug 2003. ISSN 0165-9936. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000184465600012 >.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; DE GAITANI, C. M. Enantioselective analysis of drugs: Contributions of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 683-691, Jul-Aug 2005. ISSN 0100-4042. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000230649400023 >.

BRITZ-MCKIBBIN, P.; BEBAULT, G. M.; CHEN, D. D. Y. Velocity-difference induced focusing of nucleotides in capillary electrophoresis with a dynamic pH junction. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1729-1735, Apr 2000. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000086497200001 >.

BUSNEL, J. M. et al. Evaluation of capillary isoelectric focusing in glycerol-water media with a view to hydrophobic protein applications. **Electrophoresis**, v. 26, n. 17, p. 3369-3379, Sep 2005. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231967600019 >.

CALLESEN, A. K. et al. Serum protein profiling by solid phase extraction and mass spectrometry: A future diagnostics tool? **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1428-1441, Mar 2009. ISSN 1615-9853. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264890400003 >.

CASLAVSKA, J.; THORMANN, W. Stereoselective determination of drugs and metabolites in body fluids, tissues and microsomal preparations by capillary electrophoresis (2000-2010). **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 4, p. 588-601, Jan 2011. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000286700900004 >.

CATAI, J. R. et al. Analysis of recombinant human growth hormone by capillary electrophoresis with bilayer-coated capillaries using UV and MS detection. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 852, n. 1-2, p. 160-166, Jun 2007. ISSN 1570-0232. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247286700022 >.

CHANKVETADZE, B. Separation of enantiomers with charged chiral selectors in CE. **Electrophoresis**, v. 30, p. S211-S221, Jun 2009. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000276522500023 >.

CHEN, Y. Y. et al. Carboxymethyl-beta-cyclodextrin for chiral separation of amino acids derivatized with fluoresceine-5-isothiocyanate by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. **Chinese Chemical Letters**, v. 15, n. 1, p. 112-114, Jan 2004. ISSN 1001-8417. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000188932600037 >.

CHIEN, R. L.; BURGI, D. S. Field amplified sample injection in high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 559, n. 1-2, p. 141-152, Oct 1991. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991GP17100013 >.

DAL MONTE, P. R.; ROUAN, S. K. E.; BAM, N. B. Biotechnology-Based Pharmaceuticals. In: BANKER, G. S. e RHODES, C. T. (Ed.). **Modern Pharmaceutics**. New York, USA: Marcel Dekker, v.121, 2002. cap. 22, p.29. (Drugs and the Pharmaceutical Science).

DE OLIVEIRA, A. R. M. Análise Enantiosseletiva de fármacos e metabólitos empregando eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 3, p. 17, 2011. ISSN 1984-4433.

DE SANTANA, F. J. M.; LANCHOTE, V. L.; BONATO, P. S. Capillary electrophoretic chiral determination of mirtazapine and its main metabolites in human urine after enzymatic hydrolysis. **Electrophoresis**, v. 29, n. 18, p. 3924-3932, Sep 2008. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000260242100026 >.

DOLNIK, V. Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007. **Electrophoresis**, v. 29, n. 1, p. 143-156, Jan 2008. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000252826500013 >.

EL RASSI, Z. Electrophoretic and electrochromatographic separation of proteins in capillaries: An update covering 2007-2009. **Electrophoresis**, v. 31, n. 1, p. 174-191, Jan 2010. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274042000013 >.

FANALI, S. Chiral separations by CE employing CDs. **Electrophoresis**, v. 30, p. S203-S210, Jun 2009. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000276522500022 >.

FANALI, S.; ATURKI, Z.; DESIDERIO, C. New strategies for chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 92, n. 2-3, p. 137-155, Apr 1998. ISSN 0379-0738. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000073626800005 >.

FEKETE, A.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Capillary electrophoresis. In: PICÓ, Y. (Ed.). **Food Toxicants Analysis**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2007. cap. 15, p.37.

FONSLOW, B. R. et al. Native Capillary Isoelectric Focusing for the Separation of Protein Complex Isoforms and Subcomplexes. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 15, p. 6643-6651, Aug 2010. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000280401400047 >.

FUKUSHI, K. et al. Improvement of capillary zone electrophoresis sensitivity with artificial seawater as the background electrolyte utilizing transient isotachopheresis for the determination of nitrite and nitrate ions in seawater. **Electrophoresis**, v. 21, n. 14, p. 2866-2871, Aug 2000. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000089275400016 >.

GARRIDO-MEDINA, R.; DIEZ-MASA, J. C.; DE FRUTOS, M. CE methods for analysis of isoforms of prostate-specific antigen compatible with online derivatization for LIF detection. **Electrophoresis**, v. 32, n. 15, p. 2036-2043, Aug 2011. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000294179800015 >.

GUBITZ, G.; SCHMID, M. G. Chiral separation by capillary electromigration techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1204, n. 2, p. 140-156, Sep 2008. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000259590900003 >.

GUO, A. et al. Role of CE in Biopharmaceutical Development and Quality Control. In: AHUJA, S. e JIMIDAR, M. I. (Ed.). **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, v.9, 2008. cap. 14, p.45. ISBN ISSN: 0149-6395.

HE, Y.; LEE, H. K. Large-volume sample stacking in acidic buffer for analysis of small organic and inorganic anions by capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 995-1001, Mar 1999. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000078840300023 >.

HERMELING, S. et al. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 6, p. 897-903, Jun 2004. ISSN 0724-8741. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000221685800001 >.

HOLLAND, L. A.; LEIGH, A. M. Bilayered phospholipid micelles and capillary electrophoresis: A new additive for electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 24, n. 17, p. 2935-2939, Sep 2003. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000185462800007 >.

HOQUE, M. E.; AMETT, S. D.; LUNTE, C. E. On-column preconcentration of glutathione and glutathione disulfide using pH-mediated base stacking for the analysis of microdialysis samples by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 827, n. 1, p. 51-57, Nov 2005. ISSN 1570-0232. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233327100008 >.

HORIKAWA, H.; TSUBOUCHI, M.; KAWAKAMI, K. Industry views of biosimilar development in Japan. **Health Policy**, v. 91, n. 2, p. 189-194, Jul 2009. ISSN 0168-8510. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000268013800010 >.

HSIEH, Y. L.; CHEN, T. H.; LIU, C. Y. Capillary electrochromatographic separation of proteins on a column coated with titanium dioxide nanoparticles. **Electrophoresis**, v. 27, n. 21, p. 4288-4294, Nov 2006. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242222500020 >.

HU, S.; LOO, J. A.; WONG, D. T. Human body fluid proteome analysis. **Proteomics**, v. 6, n. 23, p. 6326-6353, Dec 2006. ISSN 1615-9853. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242879000018 >.

HUANG, H. Q. et al. On-line isotachophoretic preconcentration and gel electrophoretic separation of sodium dodecyl sulfate-proteins on a microchip. **Electrophoresis**, v. 26, n. 11, p. 2254-2260, Jun 2005. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000229901500023 >.

ILYIN, S. E.; BELKOWSKI, S. M.; PLATA-SALAMAN, C. R. Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 411-416, Aug 2004. ISSN 0167-7799. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223462800010 >.

IMAMI, K. et al. Simple on-line sample preconcentration technique for peptides based on dynamic pH junction in capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, n. 2, p. 250-255, May 2007. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000246242700016 >.

ISSAQ, H. J. A decade of capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 21, n. 10, p. 1921-1939, Jun 2000. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000087767800002 >.

JIMIDAR, M. I. Theoretical considerations in performance of various modes of CE. In: AHUJA, S. e JIMIDAR, M. I. (Ed.). **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**. Amsterdam: Elsevier, v.9, 2008. cap. 2, p.9-43.

JING, P.; KANETA, T.; IMASAKA, T. On-line concentration of a protein using denaturation by sodium dodecyl sulfate. **Analytical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 37-42, Jan 2005. ISSN 0910-6340. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000226362300008 >.

JURCIC, K.; NESBITT, C. A.; YEUNG, K. K. C. Characterization of discontinuous buffer junctions using pH indicators in capillary electrophoresis for protein preconcentration. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1-2, p. 317-325, Nov 2006. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242059400039 >.

JUVANCZ, Z. et al. The role of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 29, n. 8, p. 1701-1712, Apr 2008. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000255703100016 >.

KASICKA, V. Recent advances in CE and CEC of peptides (2007-2009). **Electrophoresis**, v. 31, n. 1, p. 122-146, Jan 2010. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274042000011 >.

KITAGISHI, K. Introduction. In: SHINTANI, H. e POLONSKÝ, J. (Ed.). **Handbook of capillary electrophoresis applications**. London, England: Blackie Academic and Professional, 1996. cap. 1, p.1-14.

KURODA, Y. et al. Improved capillary electrophoresis method for the analysis of carbohydrate-deficient transferrin in human serum, avoiding interference by complement C3. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 76, p. 6, 2013.

LA, S. et al. Profiling and screening analysis of 27 aromatic amino acids by capillary electrophoresis in dual modes. **Electrophoresis**, v. 23, n. 7-8, p. 1080-1089, Apr 2002. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175436200014 >.

LACHER, N. A. et al. Development, validation, and implementation of capillary gel electrophoresis as a replacement for SDS-PAGE for purity analysis of IgG2 mAbs. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 2, p. 218-227, Feb 2010. ISSN 1615-9306. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274578000012 >.

LACUNZA, I.; DIEZ-MASA, J. C.; DE FRUTOS, M. CIEF with hydrodynamic and chemical mobilization for the separation of forms of alpha-1-acid glycoprotein. **Electrophoresis**, v. 28, n. 8, p. 1204-1213, Apr 2007. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000246116100006 >.

LARA-QUINTANAR, P. et al. Immunochromatographic removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its analysis by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p. 227-234, Jun 2007. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247282900018 >.

LAUER, H. H.; MCMANIGILL, D. Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused-silica tubing. **Analytical Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 166-170, Jan 1986. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1986AWT6800046 >.

LEADER, B.; BACA, Q. J.; GOLAN, D. E. Protein therapeutics: A summary and pharmacological classification. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 21-39, Jan 2008. ISSN 1474-1776. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000252094600012 >.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 4, p. 1250-1256, Apr 2003. ISSN 0090-3493. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182411900038 >.

LI, S. F. Y. **Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1992. 582.

LIN, C. H.; KANETA, T. On-line sample concentration techniques in capillary electrophoresis: Velocity gradient techniques and sample concentration techniques for biomolecules. **Electrophoresis**, v. 25, n. 23-24, p. 4058-4073, Dec 2004. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000225961200012 >.

LIU, Z.; OTSUKA, K.; TERABE, S. Evaluation of extended light path capillary and etched capillary for use in open tubular capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 961, n. 2, p. 285-291, Jul 2002. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000177201500009 >.

LU, Y. J.; YANG, J.; SEGA, E. Issues related to targeted delivery of proteins and peptides. **Aaps Journal**, v. 8, n. 3, p. E466-E478, 2006. ISSN 1550-7416. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000241437900005 >.

LUQUE-GARCIA, J. L.; NEUBERT, T. A. Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p. 259-276, Jun 2007. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247282900020 >.

MA, M. et al. Quaternary ammonium chitosan derivative dynamic coating for the separation of veterinary sulfonamide residues by CE with field-amplified sample injection. **Electrophoresis**, v. 28, n. 22, p. 4091-4100, Nov 2007. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251363800008 >.

MA, S.; NASHABEH, W. Analysis of protein therapeutics by capillary electrophoresis. **Chromatographia**, v. 53, p. S75-S89, 2001. ISSN 0009-5893. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000167892800010 >.

MANABE, T. Combination of electrophoretic techniques for comprehensive analysis of complex protein systems. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1116-1122, Apr 2000. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000086543800008 >.

MANDRIOLI, R. et al. Enantioselective determination of the novel antidepressant mirtazapine and its active demethylated metabolite in human plasma by means of capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1051, n. 1-2, p. 253-260, Oct 2004. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000224474000033 >.

MARSHALL, J. C. et al. Measures, markers, and mediators: Toward a staging system for clinical sepsis. A Report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 5, p. 1560-1567, May 2003. ISSN 0090-3493. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182981300043 >.

MARTH, J. D.; GREWAL, P. K. Mammalian glycosylation in immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 11, p. 874-887, Nov 2008. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260313000012 >.

MELLADO, M. C. M. et al. Sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis analysis of rotavirus-like particles. **Journal of Chromatography A**, v. 1192, n. 1, p. 166-172, May 2008. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256200700021 >.

MELLSTEDT, H.; NIEDERWIESER, D.; LUDWIG, H. The challenge of biosimilars. **Annals of Oncology**, v. 19, n. 3, p. 411-419, Mar 2008. ISSN 0923-7534. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253746200003 >.

METHUEN, T. et al. Disialotransferrin, determined by capillary electrophoresis, is an accurate biomarker for alcoholic cause of acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 34, n. 4, p. 405-409, May 2007. ISSN 0885-3177. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246500100004 >.

MIKSIK, I. et al. Matrices for capillary gel electrophoresis - a brief overview of uncommon gels. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 6-7, p. 458-465, Jun-Jul 2006. ISSN 0269-3879. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239048200002 >.

MIKUS, P.; MARAKOVA, K. Advanced CE for chiral analysis of drugs, metabolites, and biomarkers in biological samples. **Electrophoresis**, v. 30, n. 16, p. 2773-2802, Aug 2009. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269712500004 >.

MIKUS, P.; VALASKOVA, I.; HAVRANEK, E. Enantioselective determination of pheniramine in pharmaceuticals by capillary electrophoresis with charged cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 3, p. 442-448, Jul 2005. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230235200009 >.

MOORE, L. et al. Lysine-Based Zwitterionic Molecular Micelle for Simultaneous Separation of Acidic and Basic Proteins Using Open Tubular Capillary Electrochromatography. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 10, p. 3997-4005, May 2010. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000277531500007 >.

MORING, S. E.; REEL, R. T.; VANSOEST, R. E. J. Optical improvements of a z-shaped cell for high-sensitivity UV absorbency detection in capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 23, p. 3454-3459, Dec 1993. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993MK05300024 >.

MORITA, I.; SAWADA, J. Capillary electrophoresis with online sample pretreatment for the analysis of biological samples with direct-injection. **Journal of Chromatography**, v. 641, n. 2, p. 375-381, Jul 1993. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LN10200020 >.

MORZUNOVA, T. G. Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control: capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis (a review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 40, n. 3, p. 13, 2006.

NA, D. H. et al. Capillary electrophoretic separation of high-molecular-weight poly(ethylene glycol)-modified proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 373, n. 2, p. 207-212, Feb 2008. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000252514100004 >.

NGUYEN, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Chiral Drugs. An Overview. **International journal of Biomedical science**, v. 2, n. 2, p. 16, 2006.

NOWICKI, M. Basic facts about biosimilars. **Kidney & Blood Pressure Research**, v. 30, n. 5, p. 267-272, 2007. ISSN 1420-4096. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249306000001 >.

OMENN, G. S. Strategies for plasma proteomic profiling of cancers. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5662-5673, Oct 2006. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241781100022 >.

PAGEL, P. S. et al. Cardiovascular effects of verapamil enantiomer combinations in conscious dogs. **European Journal of Pharmacology**, v. 348, n. 2-3, p. 213-221, May 1998. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000074031700009 >.

PAVLOU, A. K.; BELSEY, M. J. The therapeutic antibodies market to 2008. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, n. 3, p. 389-396, Apr 2005. ISSN 0939-6411. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228005900002 >.

PERLATTI, B.; CARRILHO, E.; AGUIAR, F. A. Sample Stacking - A Versatile Approach for Analyte Enrichment in CE and Microchip-CE. In: GARCIA, C. D.; TORRES, K. C., *et al* (Ed.). **Fundamental Concepts, Practical Applications, and Limitations of Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis**. Texas, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. cap. 2, p.23-40.

PICO, Y.; RODRIGUEZ, R.; MANES, J. Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 133-151, Mar 2003. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181841400011 >.

POURHAGHIGHI, M. R.; BUSNEL, J. M.; GIRAULT, H. H. High-sensitive protein analysis by FESI-CE-MALDI-MS. **Electrophoresis**, v. 32, n. 14, p. 1795-1803, Jul 2011. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292987800002 >.

QUIGLEY, W. W. C.; DOVICH, N. J. Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 16, p. 4645-4658, Aug 2004. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223290300005 >.

RADER, R. A. (Re)defining biopharmaceutical. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 743-751, Jul 2008. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257491600016 >.

RAMAUTAR, R. et al. CE-MS for proteomics: Advances in interface development and application. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 13, p. 3814-3828, Jul 2012. ISSN 1874-3919. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000307025100002 >.

RIEKKOLA, M. L.; JONSSON, J. A.; SMITH, R. M. Terminology for analytical capillary electromigration techniques - (IUPAC recommendations 2003). **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 2, p. 443-451, Feb 2004. ISSN 0033-4545. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220677300014 >.

RIFAI, N.; GILLETTE, M. A.; CARR, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 971-983, Aug 2006. ISSN 1087-0156. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000239702300038 >.

RUSTANDI, R. R.; WASHABAUGH, M. W.; WANG, Y. Applications of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products. **Electrophoresis**, v. 29, n. 17, p. 3612-3620, Sep 2008. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000259592600015 >.

SALAS-SOLANO, O.; FELTEN, C. Capillary Electrophoresis and Bioanalysis. In: AHUJA, S. e JIMIDAR, M. I. (Ed.). **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, v.9, 2008. cap. 15, p.25.

SANTOS, M. R.; TAVARES, M. F. M.; RUBIM, J. C. Development of a laser induced fluorescence detection scheme for capillary electrophoresis. **Quimica Nova**, v. 23, n. 5, p. 585-589, Sep-Oct 2000. ISSN 0100-4042. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000089622600003 >.

SCHELLEKENS, H. How similar do 'biosimilars' need to be? **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1357-1359, Nov 2004. ISSN 1087-0156. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000224960600020 >.

SCHIESS, R.; WOLLSCHIED, B.; AEBERSOLD, R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. **Molecular Oncology**, v. 3, n. 1, p. 33-44, Feb 2009. ISSN 1574-7891. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264094700006 >.

SCHURE, M. R.; LENHOFF, A. M. Consequences of wall adsorption in capillary electrophoresis - Theory and Simulation. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 21, p. 3024-3037, Nov 1993. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993ME46900016 >.

SENTELLAS, S.; PUIGNOU, L.; GALCERAN, M. T. Capillary electrophoresis with on-line enrichment for the analysis of biological samples. **Journal of Separation Science**, v. 25, n. 15-17, p. 975-987, Dec 2002. ISSN 1615-9314. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000179959200004 >.

SIMPSON JR, S. L.; QUIRINO, J. P.; TERABE, S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. Fundamentals and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 38, 2008.

STAUB, A. et al. Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 810-822, Jun 2011. ISSN 0731-7085. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000290357600016 >.

STEEL, L. F. et al. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. **Proteomics**, v. 3, n. 5, p. 601-609, May 2003. ISSN 1615-9853. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182937000004 >.

STOSCHITZKY, K.; LINDNER, W.; KIOWSKI, W. Stereoselective vascular effects of the (R)-enantiomers and (S)-enantiomers of propranolol and atenolol. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 268-272, Feb 1995. ISSN 0160-2446. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995QD44200012 >.

STUTZ, H. Protein attachment onto silica surfaces - a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE. **Electrophoresis**, v. 30, n. 12, p. 2032-2061, Jun 2009. ISSN 0173-0835. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000268270400004 >.

TAGLIARO, F.; TURRINA, S.; SMITH, F. P. Capillary electrophoresis: Principles and applications in illicit drug analysis. **Forensic Science International**, v. 77, n. 3, p. 211-229, Feb 1996. ISSN 0379-0738. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996TZ20600008 >.

TAVARES, M. F. M. Separation mechanisms in capillary electrophoresis. **Quimica Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, Sep-Oct 1997. ISSN 0100-4042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XX09800009 >.

TERABE, S. Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography. In: (Ed.). **Annual Review of Analytical Chemistry**, v.2, 2009. p.99-120. (Annual Review of Analytical Chemistry). ISBN 1936-1327 DOI 978-0-8243-4402-3.

TSENG, H. M. et al. Analysis of mono-, di- and oligosaccharides by CE using a two-stage derivatization method and LIF detection. **Electrophoresis**, v. 30, n. 8, p. 1399-1405, Apr 2009. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000265968300015 >.

TSUDA, T.; SWEEDLER, J. V.; ZARE, R. N. Rectangular capillaries for capillary zone electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2149-2152, Oct 1990. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990EB09600022 >.

TUMANI, H. et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis. **Neurobiology of Disease**, v. 35, n. 2, p. 117-127, Aug 2009. ISSN 0969-9961. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268078300002 >.

VAN EECKHAUT, A.; DETAEVERNIER, M. R.; MICHOTTE, Y. Separation of neutral dihydropyridines and their enantiomers using electrokinetic chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 4, p. 799-805, Nov 2004. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225530100015 >.

VAN EECKHAUT, A.; MICHOTTE, Y. Chiral separations by capillary electrophoresis: Recent developments and applications. **Electrophoresis**, v. 27, n. 14, p. 2880-2895, Jul 2006. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239525700007 >.

VENTURINI, C. D. G. et al. Properties and recent applications of cyclodextrins. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008. ISSN 0100-4042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000254295500032 >.

WANG, S. F.; YANG, P.; CHENG, Y. Y. Analysis of tetracycline residues in bovine milk by CE-MS with field-amplified sample stacking. **Electrophoresis**, v. 28, n. 22, p. 4173-4179, Nov 2007. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000251363800019 >.

WEINBERGER, R. Capillary Zone Electrophoresis Basic Concepts. In: WEINBERGER, R. (Ed.). **Practical Capillary Electrophoresis**. Second. USA: Academic Press, 2000. cap. 2, p.25-72. ISBN 978-0127423562.

WEISS, D. J.; SAUNDERS, K.; LUNTE, C. E. pH-Mediated field-amplified sample stacking of pharmaceutical cations in high-ionic strength samples. **Electrophoresis**, v. 22, n. 1, p. 59-65, Jan 2001. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166282500012 >.

WILLIAMS, M. L.; WAINER, I. W. Role of chiral chromatography in therapeutic drug monitoring and in clinical and forensic toxicology. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, n. 2, p. 290-296, Apr 2002. ISSN 0163-4356. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000174510500010 >.

WU, Y. W. et al. MEKC determination of IgG in human serum via a pH-mediated acid stacking method. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 19, p. 3068-3074, Sep 2010. ISSN 1615-9306. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283201900017 >.

_____. Field-amplified sample injection for the determination of albumin and transferrin in human urines by MEKC. **Electrophoresis**, v. 30, n. 4, p. 668-673, Feb 2009. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264364500016 >.

ZHANG, L. et al. A strategy for the development of biomarker tests for PTSD. **Medical Hypotheses**, v. 73, n. 3, p. 404-409, Sep 2009. ISSN 0306-9877. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268643900038 >.

ZHANG, L. Y.; SUN, M. X. Field-amplified sample injection and in-capillary derivatization for sensitivity improvement of the electrophoretic determination of histamine. **Journal of Chromatography A**, v. 1100, n. 2, p. 230-235, Dec 2005. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234532500014 >.

ZHANG, S. H. et al. Capillary electrochromatography of proteins and peptides with a cationic acrylic monolith. **Journal of Chromatography A**, v. 887, n. 1-2, p. 465-477, Jul 2000. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088315800035 >.

ZHANG, Y. P. et al. Comparative study on the chiral separation of phenyl alcohols by capillary electrophoresis and liquid chromatography. **Electrophoresis**, v. 25, n. 16, p. 2711-2719, Aug 2004a. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223713000009 >.

_____. Multivariate optimization of a sulfated-beta-cyclodextrin-modified capillary zone electrophoretic method for the separation of chiral arylalcohols. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 25, n. 3, p. 377-381, Mar 2004b. ISSN 0253-2964. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220535000011 >.

ZHOU, L. L. et al. Evaluation of chiral purity for a substituted imidazole p38 MAP kinase inhibitor and its intermediates using a single chiral capillary electrophoresis method. **Electrophoresis**, v. 25, n. 16, p. 2860-2865, Aug 2004. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223713000027 >.

***CAPÍTULO 1: ANÁLISE DA ALFA-1
GLICOPROTEÍNA ÁCIDA POR
ELETROFORESE CAPILAR EM AMOSTRAS
DE PLASMA DE PACIENTES COM SEPSE***

---

1. INTRODUÇÃO

A sepse é uma síndrome clínica complexa desencadeada por infecção, geralmente de origem bacteriana, sendo também decorrente de outros microrganismos (como fungos ou vírus). Essa doença apresenta sintomas e sinais variados, incluindo inflamação sistêmica descontrolada seguida de imunossupressão (NASCIMENTO et al., 2010). Ainda, é caracterizada por um processo progressivo de lesão tecidual, em que a mortalidade decorrente de disfunção orgânica múltipla representa sua expressão mais grave (MONKHOUSE, 2006; JEAN-BAPTISTE, 2007).

Termos e definições imprecisas foram utilizados por muito tempo nos casos de sepse, dificultando a identificação do quadro real e a instauração de uma terapia precoce. Deste modo, a sepse e suas graduações foram definidas durante uma reunião da Sociedade de Terapia Intensiva Americana, sendo os termos bacteremia, SIRS (síndrome de resposta inflamatória sistêmica), sepse, sepse grave, choque séptico e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (DMOS) regulamentados, de forma a facilitar a linguagem para clínicos e pesquisadores (BONE; SIBBALD; SPRUNG, 1992a)

Com relação a epidemiologia desta doença, segundo estudos da *Brazilian Sepsis Epidemiological Study* a incidência de sepse no Brasil é de 57 para cada 1000 pacientes-dia admitidos nas Unidades de Terapia Intensiva com índice de mortalidade de aproximadamente 34,7 % para aqueles pacientes com sepse grave, podendo chegar a 52,2 % no caso de pacientes que evoluem para choque séptico, uma das principais complicações observadas nesta patologia (SILVA et al., 2004). Assim, a sepse é uma importante causa de mortalidade no ambiente de terapia intensiva. Cada vez mais, torna-se claro que o reconhecimento precoce e o diagnóstico preciso da sepse são imprescindíveis, assim como o uso de terapias eficientes, como reanimação precoce e antibioticoterapia, que são fundamentais para garantir a sobrevivência do paciente.

A primeira fase em uma infecção é a colonização do hospedeiro pelos patógenos. As barreiras epiteliais, tais como a superfície da pele e das mucosas, são constituídas por células epiteliais que atuam de forma efetiva contra a invasão dos microrganismos e, somado a isso, as fortes junções entre as células adjacentes evitam o fácil acesso do patógeno ao interior do organismo. Por outro lado, quando há o rompimento dessas barreiras, como por ulcerações e queimaduras, pode ocorrer a translocação de microrganismos decorrente das lesões que propiciam a entrada dos patógenos, levando a um processo infeccioso local ou sistêmico. A resposta à infecção é desencadeada por uma complexa cascata de citocinas e ativação de

células do sistema imune, na qual a migração de leucócitos para o foco da infecção é um dos eventos centrais. O processo de migração é iniciado com o rolamento dos leucócitos sobre o endotélio, seguido de sua ativação, firme adesão, transmigração e, finalmente, transmigração do leucócito até o foco infeccioso (JOYCE; NELSON; GRINNELL, 2004). Além disso, estas células também liberam mediadores quimiotáticos amplificando o recrutamento de outras células para o foco infeccioso (YAMASHIRO et al., 2001; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; KONG et al., 2005). Os neutrófilos são os principais leucócitos recrutados para o sítio de uma infecção. Essas células são idealmente adequadas para a eliminação de bactérias patogênicas, devido a sua capacidade de fagocitose, liberando os grânulos contendo enzimas líticas e polipeptídios antimicrobianos (SEGAL, 2005). Dessa maneira, a migração dessas células para o local da infecção é de extrema importância para o controle do crescimento bacteriano e, conseqüentemente, evita a morte do hospedeiro que seria causada pela disseminação bacteriana (MALAWISTA; MONTGOMERY; VAN BLARICOM, 1992; ALVES-FILHO et al., 2006).

Embora os neutrófilos sejam cruciais no combate às infecções, nas formas mais severas da sepse, observa-se falência da migração deste tipo celular (ALVES et al., 2008, 2010). Ainda, os neutrófilos que não migraram para o local da infecção, acabam sendo sequestrados em órgãos secundários distantes do local da infecção, como o pulmão, provocando lesão tecidual e perda da função orgânica (ASADUZZAMAN et al., 2008; OZTURK et al., 2008; ELPHICK et al., 2009; ZHANG et al., 2009).

Paralelamente, tem-se observado que o aumento de mediadores inflamatórios e citocinas circulantes contribuem para a falência da migração de neutrófilos para o foco da infecção. Além disso, esses mediadores inflamatórios também são, comumente, responsáveis pela regulação da concentração das proteínas de fase aguda (*Acute Phase Proteins*, APPs), as quais tem sua concentração plasmática alterada durante a sepse (CASTRIOTA et al., 2007). As APPs possuem um papel anti-inflamatório, principalmente por inibirem a migração de neutrófilos e a produção de citocinas pró-inflamatórias (TILG et al., 1993; HEUERTZ et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2007; LIANG et al., 2009), fato que, também, foi atribuído alfa-1-glicoproteína ácida (α 1-AGP), uma proteína de fase aguda (MESTRINER et al., 2007).

A α 1-AGP (figura 1.1), também chamada de orosomucoide, é uma proteína do soro altamente glicosilada. A da α 1-AGP ocorre principalmente nos hepatócitos, e sua expressão é regulada por várias citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina (IL)-6 e IL-12, mas também pode ser sintetizada por tecidos (FOURNIER; MEDJOUBI-N; PORQUET, 2000; HOCHÉPIED et al., 2003).

Figura 1.1. Estrutura cristalina da $\alpha 1$ -AGP recombinante humana sem glicosilação. C – representa a extremidade carboxi-terminal e N a extremidade amino-terminal. Adaptado de Scirè et al. (2013).

A $\alpha 1$ -AGP é constituída por 183 resíduos de aminoácidos e apresenta massa molecular variando entre 41 kDa e 43 kDa. Cerca de 45 % de seu peso é devido a carboidratos, como hexose, hexosamina e ácido siálico presentes. É carregada negativamente, com pI variando de 2,7 a 3,8, devido a presença da grande quantidade de ácido siálico (HOCHEPIED et al., 2003; MESTRINER et al., 2007; SCHONFELD et al., 2008).

A $\alpha 1$ -AGP apresenta cinco sítios para a ligação a carboidratos, sendo todas estas ligações do tipo N-glicosilação, as quais são realizadas na asparagina-15, -38, -54, -75 e -85 (CECILIANI; POCACQUA, 2007). Cada sítio de ligação pode se ligar a diferentes grupos de carboidratos, os quais podem ser bi, tri ou tetra ramificados, formando assim as diferentes glicoformas da proteína. Normalmente são encontradas no soro/plasma humano de 12 a 20 glicoformas da $\alpha 1$ -AGP (CECILIANI; POCACQUA, 2007; MESTRINER et al., 2007; ONGAY et al., 2010).

De acordo com os grupos de carboidratos ligados a proteína diferentes estruturas moleculares são apresentadas, que comandam as interações com outras moléculas, podendo promover ou inibir ligações intra e intermolecular, produzindo assim, numerosos biomarcadores, alguns dos quais correlacionados com diferenciação, ativação celular e doenças (OHTSUBO; MARTH, 2006; BROOKS, 2009).

A função fisiológica da $\alpha 1$ -AGP ainda não está bem definida, embora um número considerável de atividades *in vitro* e *in vivo* já tenha sido descrito. A $\alpha 1$ -AGP apresenta efeito modulatório sobre vários tipos celulares do sistema imune, incluindo macrófagos, monócitos,

neutrófilos, linfócitos além de inibir a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato ADP ou epinefrina de maneira dose dependente (HOCHEPIED et al., 2003).

A α 1-AGP é uma proteína de fase aguda, cuja concentração plasmática aumenta em resposta ao estado inflamatório, decorrente de infecções, ferimentos, cirurgias, trauma ou outras lesões teciduais (HOCHEPIED et al., 2003; PETERSEN; NIELSEN; HEEGAARD, 2004). De uma maneira geral, esse aumento é um reforço nos mecanismos de defesa do organismo que inibem ou neutralizam as enzimas lisossomais liberadas pelos leucócitos fagocitários durante a necrose tissular. O interesse essencial de dosar as proteínas de fase aguda é permitir o registro de surtos inflamatórios, desde o início até o fim do processo e acompanhar as flutuações da doença, bem como avaliar a eficácia da terapêutica anti-inflamatória e finalmente, permitir o entendimento das diferentes glicoformas quanto a sua razão/proporção em doenças inflamatórias que ainda não esta estabelecida.

Os procedimentos analíticos mais utilizados para quantificação da α 1-AGP, em soro ou plasma, são a imunoturbidimetria (LE COUTRE et al., 2002; COLOMBO et al., 2006; MESTRINER *et al.*, 2007), a imunodifusão radial (ARNOLD; MEYERSON, 1990; CLAPPERTON et al., 2007; PALTRINIERI et al., 2007), a imunoeletroforese por afinidade cruzada (SLUZEWSKA et al., 1996) e a eletroforese capilar (LACUNZA, et al., 2006).

2. OBJETIVOS

Os objetivos desta etapa foram:

- Otimizar as condições para análise da α 1-AGP por eletroforese capilar;
- Validar o método otimizado para análise da α 1-AGP por eletroforese capilar;
- Aplicar o método validado em plasma de pacientes com sepse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes e Soluções

O padrão de α -1 AGP, purificada de plasma humano, foi obtido da Sigma Aldrich (Missouri, EUA), com 99 % de pureza. A partir deste padrão foram preparadas soluções por dissolução em água, obtendo-se uma solução estoque na concentração de $5.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, a qual foi utilizada durante a otimização do método. As soluções de trabalho de α -1 AGP utilizadas durante a etapa de validação do método foram preparadas diariamente por diluição da solução estoque com água para as concentrações de 250, 500, 1.000, 2.000, 3.000 e 4.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína. As soluções de trabalho foram estocadas em tubos de vidro âmbar sob refrigeração a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para a otimização das condições de análise da α -1 AGP, foram empregados reagentes grau HPLC ou analítico. Foram utilizados os seguintes reagentes: acetato de sódio, ureia, cloreto de sódio e polissorbato 20 (Merck, California, EUA); tricina, putrescina, polissorbato 20 e 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS) (Sigma Aldrich, Missouri, EUA), hidróxido de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e ácido acético glacial (J.T. Baker, New Jersey, EUA). Todas as soluções foram filtradas em dispositivos filtrantes confeccionados em poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) de $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade (Millipore, Massachusetts, EUA) antes do uso e a água utilizada no preparo dos eletrólitos de corrida e na lavagem do capilar foi água ultrapura (Millipore, Massachusetts, EUA). Os eletrólitos de corrida foram preparados pesando-se quantidades adequadas dos reagentes, dissolvendo-os em água e ajustando-se o pH com solução de ácido acético glacial (1:1, v/v, em água) ou solução de hidróxido de sódio (NaOH) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Os componentes empregados no preparo das soluções foram pesados em balança analítica modelo CP224S (Sartorius, New York, EUA). Para desgaseificação das soluções foi utilizado um aparelho de ultra-som modelo Q3350 (Quimis, São Paulo, Brasil).

3.2. Equipamento e condicionamento do capilar

As análises eletroforéticas da α -1 AGP foram realizadas em um sistema de CE modelo G1600A (Agilent Technologies, Waldbroon, Alemanha), composto por analisador e detector por absorção no UV-VIS com arranjo de diodos, operando em 214 nm. As injeções foram

realizadas por amostrador automático. O equipamento foi controlado pelo *software* Chemstation® 3D-CE, versão B.04.01, o qual também foi usado na aquisição e tratamento dos dados.

O capilar de sílica fundida revestido externamente por uma camada de poliimida foi adquirido em rolos de 25 m (Microsolv, New Jersey, EUA). O capilar empregado na otimização do método eletroforético possuía 50 µm de diâmetro interno e a janela óptica de detecção ($\approx 0,5$ cm de comprimento) foi obtida pela remoção do revestimento de poliimida a 8,5 cm de uma das extremidades do capilar, pela aplicação de calor. A poliimida queimada foi removida com o auxílio de um algodão embebido em acetona (Mallinckrodt, Kentucky, EUA).

Antes do primeiro uso, os capilares novos foram condicionados por lavagem com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ durante 30 min e água ultrapura durante 30 min. No início de cada dia, o capilar era condicionado com uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹ durante 10 min, seguido de uma etapa de lavagem com água ultrapura por 10 min e uma terceira etapa com o eletrólito de análise durante os mesmos 10 min. Entre as análises o capilar foi condicionado por 6 min com NaOH 0,1 mol L⁻¹, 6 min com água ultrapura e 5 min com o eletrólito de análise. Ao final das análises, o capilar foi lavado com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 15 min, seguido por uma etapa de lavagem com água ultrapura durante os mesmos 15 min. Durante o armazenamento, as extremidades do capilar permaneceram imersas em água ultrapura.

3.3. Pacientes

Foram incluídos 5 (cinco) pacientes com quadro clínico laboratorial de sepse grave ou choque séptico (**Anexo I**) classificados de acordo com as definições do consenso de 1992 (BONE; SIBBALD; SPRUNG, 1992b) e revistas em 2001 (LEVY et al., 2003), admitidos no Centro de Terapia Intensiva (CTI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP), da Universidade de São Paulo na cidade de Ribeirão Preto. A assinatura do termo de consentimento (**Anexo II**) foi obtida juntamente com o paciente no momento de sua admissão no CTI. Quando o paciente não apresentava condições clínicas suficientes para assinar o termo, o mesmo foi obtido a partir da autorização de seu representante legal, em um prazo não superior a 48 horas. O termo de consentimento deste

projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP (certificado nº 8708/2009, **Anexo III**).

A inclusão dos pacientes foi realizada entre o primeiro e o quinto dia depois do diagnóstico clínico de sepse grave ou choque séptico. Foram incluídos pacientes com idade entre 58 e 81 anos de ambos os sexos. Os pacientes tiveram escores APACHE II > 8 (Cálculo do APACHE II, **Anexo IV**).

➤ Coleta de sangue

Amostra de 10 mL de sangue foi coletada por punção venosa, pelo médico ou enfermeiro intensivista responsável pelo paciente, juntamente com os exames de rotina, em tubos apropriados contendo o anticoagulante EDTA. Após as coletas, as amostras de sangue foram submetidas a força centrífuga de 1.800 g, o plasma coletado e armazenado a -20 °C até o momento da análise.

➤ Plasmas

As amostras de plasma humano (branco e controle) utilizadas no desenvolvimento e validação do método foram gentilmente cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP e armazenadas a -20 °C até o momento das análises. Todas as amostras apresentavam sorologia negativa para hepatite B e C, chagas e HIV. Antes do uso, as amostras de plasma foram descongeladas à temperatura ambiente e submetidas a força centrífuga de 1.800 g para remoção de partículas suspensas.

3.4. Otimização das condições analíticas

Para realização dos experimentos de otimização utilizou-se uma solução de proteína na concentração 5.000 µg mL⁻¹, tensão de 30 kV (modo positivo), a uma temperatura de 35 ± 0,5 °C, injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 30 s e capilar de 70 cm de comprimento efetivo.

➤ Avaliação do tipo e concentração da solução de eletrólitos

Diferentes tipos de eletrólitos foram avaliados nas análises do α1-AGP: solução tampão acetato de sódio (de 20 a 100 mmol L⁻¹, com pH de 4,5) acrescida de polissorbado 20,

e eletrólitos de corrida constituído por tricina, putrescina, ureia, acetato de sódio e cloreto de sódio e pH da solução de 4,5. As concentrações de alguns dos constituintes da solução de eletrólitos foram variadas de modo a se obter melhores resultados. Estas análises foram realizadas em capilar de sílica fundida não revestido internamente (50 μm diâmetro interno e 70 cm comprimento efetivo).

➤ Avaliação do comprimento do capilar

A escolha das dimensões do capilar é muito importante durante a otimização do método, pois esta tem efeitos sobre vários fatores como tempo de migração e resolução. Sendo assim, comprimentos de capilar de 70, 60 e 50 cm de comprimento efetivo foram avaliados, na tentativa de melhorar as condições de análise.

3.5. Procedimento de preparação da amostra

O procedimento de extração baseou-se no método descrito por Stumpe et al. (2006) para isolar e quantificar a concentração total de $\alpha 1$ -AGP em plasma de neonatos por HPLC.

A extração foi realizado pela precipitação ácida do plasma humano (0,5 mL de amostra) com a adição de ácido perclórico 0,5 mol L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemanha), o qual foi adicionado ao plasma na proporção de 2:1 (v/v). A mistura foi agitada durante 30 s em um agitador de tubos modelo VIBRAX VXR *basic* (IKA, Stauffen, Alemanha) e em seguida submetidas a uma força centrífuga de 1.800 g durante 15 min à temperatura de 4 ± 1 °C, empregando uma centrífuga modelo himac CF9RX/CF12RX (Hitachi, Tokyo, Japão).

O sobrenadante foi coletado e o pH da solução basificado com uma solução tampão TRIS-HCl 3 mol L⁻¹ pH 8,8. Após este procedimento a amostra foi filtrada para a remoção dos componentes de baixa massa molecular e concentrada a 250 μL em água empregando um dispositivo filtrante para centrifuga com membrana de 10 kDa de poro nominal e volume de 4 mL modelo Amicon® Ultra 10K (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

Padrões e amostras extraídas foram armazenadas a 4 ± 1 °C caso não fossem imediatamente analisadas.

3.6. Validação do Método

Após a otimização das condições de análise e extração da α 1-AGP realizou-se a validação do método, a qual incluiu os procedimentos requeridos para demonstrar que o método é confiável para a aplicação desejada (ANVISA, 2012).

A validação do método foi realizada avaliando-se os principais parâmetros propostos (FDA, 2001; ANVISA, 2012) para análise em fluidos biológicos: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e estabilidade.

As amostras de plasma utilizadas na validação foram previamente processadas, conforme descrito no item 3.5, e, após este procedimento, enriquecidas com 50 μ L da solução padrão de α 1-AGP. Todos os valores obtidos durante a realização da validação foram subtraídos do valor proveniente do branco (concentração basal). Para a realização dos cálculos da validação foram tomados como base os valores provenientes de quatro glicoformas (G3, G4, G5 e G6) devido à dificuldade de integração das demais glicoformas nas baixas concentrações.

Para assegurar a correta correlação entre as glicoformas de mesma razão carga/tamanho, durante a realização dos experimentos de validação e análise das amostras dos pacientes, parâmetros como a razão entre o tempo de migração da glicoforma e do fluxo eletrosmótico e a mobilidade efetiva das glicoformas foram empregados.

➤ Seletividade

A seletividade foi avaliada pela comparação das inclinações de 6 (seis) curvas de calibração (cinco níveis de concentração) em 6 (seis) amostras de fontes distintas de matriz biológica (contendo nível basal do analito), obtidas pelo método de adição de padrão, e da curva padrão em solução.

O método é considerado seletivo quando as inclinações das curvas não forem significativamente diferentes (nível de significância de 5 %). Sendo estabelecido, também, para tal propósito que o coeficiente de variação dos coeficientes angulares das seis curvas de confeccionadas por adição do padrão e a curva do padrão não deve ser superior a 15 %.

➤ Linearidade

A linearidade do método foi avaliada de acordo com a construção da curva de calibração analítica de amostras de plasma enriquecidas com soluções-padrão de $\alpha 1$ -AGP (50 μL) de modo a se obter concentrações finais de 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As curvas de calibração foram traçadas plotando-se a área dos picos da $\alpha 1$ -AGP no eixo das ordenadas (eixo y) e a concentração no eixo das abscissas (eixo x).

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, em que a relação área/concentração é expressa pela equação da reta ($y = ax + b$), sendo a o coeficiente angular e b o coeficiente linear da reta. Também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r), parâmetro este que é uma estimativa da linearidade da curva de calibração analítica.

➤ Precisão e Exatidão

Precisão do método é o grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuadas várias vezes em uma amostra homogênea, sob condições pré-estabelecidas. A precisão é expressa em termos do coeficiente de variação (CV), determinado de acordo com a equação 1.1:

$$CV(\%) = \frac{s}{x} \times 100 \quad (1.1)$$

em que: x é a concentração média das medições, s é o desvio padrão. A exatidão é o grau de concordância de um valor determinado com o valor nominal ou valor verdadeiro conhecido sob condições determinadas (SHAH et al., 2000). A exatidão normalmente é calculada em função da porcentagem do erro relativo (ER, %), de acordo com a equação 1.2:

$$Exatidão (\%) = \frac{(\text{Valor obtido} - \text{Valor teórico})}{\text{Valor teórico}} \times 100 \quad (1.2)$$

Na avaliação da precisão e exatidão foram preparadas amostras de plasma branco fortificadas com solução-padrão $\alpha 1$ -AGP resultando nas concentrações de 125, 250, 500,

1.000 e 2.500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram preparadas de acordo com o procedimento descrito no item 3.5.

Para avaliar a precisão e exatidão intra e inter-ensaio foi feito uma curva de calibração analítica, em triplicata, no intervalo de concentração de 125 a 2.500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de $\alpha 1$ -AGP. Na precisão e exatidão intra-ensaio foram analisadas amostras nas concentrações acima especificadas em quintuplicata de cada concentração. A precisão e exatidão inter-ensaios foram avaliadas em cinco dias consecutivos, utilizando cinco diferentes concentrações em quintuplicata.

Conforme preconizado, para os testes de precisão e exatidão não são admitidos valores fora da faixa de $\pm 15 \%$ (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o LQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20 \%$ (vinte por cento) do valor nominal (ANVISA, 2012).

➤ Limite de Quantificação (LQ)

O LQ foi determinado enriquecendo amostras de plasma branco com solução-padrão de $\alpha 1$ -AGP na concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em sextuplicata. Para isto, 50 μL da solução padrão de $\alpha 1$ -AGP na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram transferidos para *vials* de amostra contendo 50 μL de plasma branco. O limite de quantificação foi calculado baseado em uma curva de calibração analítica nas concentrações de 125, 250, 500, 1.000 e 2.500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de $\alpha 1$ -AGP, em triplicata. O LQ será considerado adequado se os valores de precisão e exatidão, calculados pelo coeficiente de variação (CV, %) e erro relativo (ER, %), respectivamente, estiverem abaixo de 20 % (ANVISA, 2012).

➤ Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade foi realizado para se avaliar a estabilidade da proteína durante o manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento), curta duração (à temperatura ambiente) e após ciclos de congelamento e descongelamento. Tais ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise da amostra (FDA, 2001; ANVISA, 2012).

Para a avaliação da estabilidade da $\alpha 1$ -AGP durante o ciclo de congelamento/descongelamento, foram utilizadas amostras de plasma enriquecidas com solução padrão de $\alpha 1$ -AGP nas concentrações plasmáticas de 250 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em

triplicata. Após o enriquecimento das amostras, estas foram congeladas a -20 ± 1 °C por 12 h, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas as amostras foram novamente congeladas a -20 ± 1 °C por 12 h e, assim sucessivamente, até completar os três ciclos, quando estas foram analisadas.

Para a avaliação da estabilidade da $\alpha 1$ -AGP durante o ensaio de estabilidade de curta duração, foram utilizadas amostras de plasma enriquecidas com solução padrão nas concentrações plasmáticas de 250 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em triplicata. Após o enriquecimento das amostras, estas permanecerem a temperatura ambiente (23 ± 1 °C) na bancada de trabalho por um período não inferior a 12 h, sendo analisadas em seguida.

Para a estabilidade de longa duração as amostras de plasma fortificadas com solução padrão de $\alpha 1$ -AGP, nas mesmas concentrações descritas anteriormente, foram congeladas a -20 ± 1 °C por sete dias e descongeladas à temperatura ambiente, precedendo-se em seguida a análise. As amostras submetidas aos estudos de estabilidade foram analisadas e os resultados foram comparados a amostras recém-preparadas.

Os dados relativos aos estudos de estabilidade foram submetidos à análise de variância *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett, assim como, pelo teste *t* de *Student*, com nível de significância considerado foi de 5 % ($p < 0,05$). Para realização da análise estatística usou-se o programa Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad, California, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização do Método

A α -1 AGP é uma proteína de fase aguda altamente glicosilada, em que 10 a 12 % destes carboidratos são ácidos (ácido siálico). Esta variação no conteúdo de ácido siálico confere a esta proteína característica ácida, e as diferenças entre as complexas estruturas de carboidratos ligadas a proteína originam várias glicoformas com pI entre 2,8 e 3,8 (MESTRINER et al., 2007). Em pHs, ligeiramente, acima de 4,0 esta proteína ainda encontra-se na forma ionizada, ou seja, negativamente carregada. A maioria dos métodos desenvolvidos por CE para separar esta proteína utiliza capilares revestidos internamente e/ou soluções tampão com baixo valor de pH, com um ou mais aditivos (KAKEHI et al., 2001; SEI et al., 2002; LACUNZA et al., 2006). Estes procedimentos permitem uma melhor solubilidade e redução das interações da proteína com a parede interna do capilar. Interação esta que pode afetar negativamente a resolução dos picos. Sendo assim, os testes iniciais foram realizados usando solução de eletrólitos de corrida com pH próximo a 4,0.

O eletrólito de corrida utilizado como ponto de partida para a separação das glicoformas da α -1 AGP foi uma solução tampão acetato de sódio, em diferentes concentrações, contendo 0,5 % de polissorbato 20 e valor de pH mantido em 4,5, conforme mencionado por Kakehi et al. (2001). Utilizando estas soluções como eletrólito de corrida não foi possível a completa separação das glicoformas (figura 1.2). Esta falha na separação, provavelmente, se deve a diferenças entre o capilar utilizado por Kakehi et al. (2001) (capilar DB-1, o qual apresenta dimetilpolisiloxano como grupo ligante) e o utilizado neste presente trabalho, o qual não era revestido internamente, assim como a possível adsorção da proteína na parede do capilar (KINOSHITA et al., 2000; DOLNIK, 2008).

Figura 1.2. Eletroferograma referente à análise da $\alpha 1$ -AGP, mostrando as diferentes glicoformas. A análise foi realizada usando um capilar de sílica fundida (50,0 μm diâmetro interno e 70 cm comprimento efetivo), eletrólito de corrida constituído por solução tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} com pH de 4,5 adicionado de polissobato 20 0,5 % (v/v). Tensão aplicada 20 kV; Temp. 35 °C e injeção hidrodinâmica (50 mbar, 30 s).

Diante dos resultados obtidos foi utilizado um eletrólito de corrida composto por tricina, putrescina, ureia, acetato de sódio e cloreto de sódio, pH de 4,5, conforme preconizado por Lacunza et al. (2006). A partir desta solução de eletrólito foi possível separação de 8 glicoformas da α -1 AGP, porém, com tempo de migração muito elevado (figura 1.3).

A partir destes resultados, iniciou-se a otimização dos constituintes do eletrólito de corrida e do comprimento do capilar, na tentativa de reduzir o tempo de migração, sem perda de resolução entre as glicoformas.

Figura 1.3. Eletroferograma referente à análise da $\alpha 1$ -AGP, mostrando as diferentes glicoformas (G1 – G8). A análise foi realizada usando capilar de sílica fundida (50,0 μm diâmetro interno e 70 cm comprimento efetivo), eletrólito de corrida constituído por 10 mmol L^{-1} tricina, 10 mmol L^{-1} cloreto de sódio, 10 mmol L^{-1} acetato de sódio, 7 mmol L^{-1} ureia, 3,9 mmol L^{-1} putrescina, com pH de 4,5. Tensão aplicada 30 kV; Temp. 35 °C e injeção hidrodinâmica (50 mbar, 30 s).

4.1.1. Comprimento do Capilar

A escolha das dimensões do capilar é importante, pois interfere no tempo de migração, resolução, dissipação do calor e adsorção (WEINBERGER, 2000). Sendo assim, com o objetivo de reduzir o tempo de migração, foi avaliado inicialmente o comprimento do capilar. A Figura 1.4 mostra a influencia do comprimento do capilar sobre o tempo de migração e a resolução.

Conforme observa-se na figura 1.4A, a redução do comprimento de capilar proporcionou uma redução significativa no tempo de migração, porém, não foi observada diferença significativa na resolução entre as glicoformas (figura 1.4B). Este fato pode ser explicado pela baixa difusão e baixa mobilidade das glicoformas, deste modo não afetando de maneira significativa a resolução (WEINBERGER, 2000; ALTRIA, 1996). Diante destes resultados um capilar de comprimento efetivo de 50 cm foi utilizado nos demais experimentos.

Figura 1.4. Efeito do comprimento efetivo do capilar no (A) Tempo de migração (referente ao tempo de migração da glicoforma 8) e (B) Resolução (entre as glicoformas 4 e 5). A análise foi realizada usando capilar de sílica fundida (50,0 μm diâmetro interno), 10 mmol L^{-1} tricina, 10 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} acetato de sódio, 7 mol L^{-1} ureia, 3,9 mmol L^{-1} putrescina, pH 4,5 como eletrólito de corrida. Tensão aplicada 30 kV; Temp. 35°C e Injeção hidrodinâmica (50 mbar, 30 s).

4.1.2. Concentração de Ureia

A ureia é utilizada para aumentar a viscosidade de soluções aquosas, inibir a agregação e facilitar a solubilização de proteínas (KINOSHITA et al., 2000). Porém, quando utilizada em altas concentrações a ureia pode precipitar durante a análise eletroforética, acarretando imprecisões nas análises. Assim, foram avaliadas as concentrações de 4 a 7 mol L^{-1} .

Conforme observa-se na figura 1.5A, uma significativa redução no tempo de migração foi observada à medida que a concentração de ureia foi reduzida, devido à redução na viscosidade do eletrólito de corrida (ALTRIA, 1996). Entretanto, um aumento no tempo de migração é notado quando foi utilizada 4 mol L^{-1} de ureia. Este fato pode ser explicado pela incompleta inibição da agregação entre moléculas da proteína. Esta agregação forma-se pelas ligações de hidrogênio intermoleculares e pela não interrupção de interações hidrofóbicas e não-covalentes, levando assim a um aumento no tempo de migração (YU et al., 2005).

A redução no tempo de migração é acompanhada de redução na resolução, conforme observado na figura 1.5B. Esta redução pode ser explicada por redução da viscosidade da solução, levando a um aumento da difusão das glicoformas e consequentemente redução na resolução das glicoformas (ALTRIA, 1996). Assim, optou-se por manter a concentração de ureia em 7 mol L^{-1} nos demais experimentos, de forma a não perder a resolução entre os picos, a qual ficou acima de 1,5.

Figura 1.5. Efeito da concentração de ureia (A) Tempo de migração (referente ao tempo de migração da glicofoma 8) e (B) Resolução (entre as glicofomas 4 e 5). A análise foi realizada usando capilar de sílica fundida (50,0 μm diâmetro interno x 50,0 comprimento efetivo), 10 mmol L⁻¹ tricina, 10 mmol L⁻¹ NaCl, 10 mmol L⁻¹ acetato de sódio, 3,9 mmol L⁻¹ putrescina, pH 4,5 como eletrólito de corrida. Tensão aplicada 30 kV; Temp. 35°C e Injeção hidrodinâmica (50 mbar, 30 s).

A figura 1.6 mostra o eletroferograma após a avaliação da composição da solução de eletrólitos e comprimento do capilar na análise da $\alpha 1$ -AGP.

Figura 1.6. Eletroferograma referente à análise da $\alpha 1$ -AGP, mostrando as diferentes glicofomas (G1 – G8). A análise foi realizada usando capilar de sílica fundida (50 μm diâmetro interno e 50 cm comprimento efetivo), 10 mmol L⁻¹ tricina, 10 mmol L⁻¹ NaCl, 10 mmol L⁻¹ acetato de sódio, 7 mol L⁻¹ ureia, 3,9 mmol L⁻¹ putrescina, pH 4,5 como eletrólito de corrida. Tensão aplicada 30 kV; Temp. 35°C e Injeção hidrodinâmica (50 mbar, 30 s).

4.2. Validação do Método

➤ Estabilidade

A estabilidade das glicoformas da $\alpha 1$ -AGP foi avaliada nos ciclos de congelamento/descongelamento, bancada por 12 h e longa duração. Os analitos mostraram-se estáveis nas condições estudadas, pois não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as amostras recentemente preparadas e processadas e aquelas submetidas ao estudo de estabilidade (tabela 1.1). A análise estatística foi feita usando o teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett. Além disso, foi realizado o teste *t* de *Student* que corroborou com os resultados gerados pela análise de variância.

Tabela 1.1. Estabilidade das glicoformas da $\alpha 1$ -AGP nos ciclos de congelamento/descongelamento, bancada por 12 h e longa duração

Glicoforma	Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ANOVA	
		F-valor ^a	p-valor
G3	250	0,19	0,90
	1000	1,00	0,44
G4	250	0,38	0,77
	1000	1,13	0,39
G5	250	0,43	0,74
	1000	1,16	0,27
G6	250	0,95	0,46
	1000	0,99	0,45

^a $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}} = 3,49$

➤ Seletividade

Devido à impossibilidade em se obter uma matriz isenta do analito, a seletividade foi avaliada pela comparação dos coeficientes angulares da curva de calibração analítica em solução padrão e de seis curvas de calibração, feitas com adição padrão em seis diferentes amostras de plasma, as quais continham nível basal do analito.

Os dados relativos à seletividade do método foram submetidos à análise de variância *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, com nível de significância considerado de 5% ($p < 0,05$). De acordo com os dados apresentados na tabela 1.2, o método foi considerado seletivo, pois as inclinações das curvas não foram significativamente diferentes. Além disso, o coeficiente de variação dos coeficientes angulares das seis curvas de calibração em amostras de plasma e da curva de calibração analítica em solução padrão não foi superior a 15 %.

Tabela 1.2. Seletividade do método

	Padrão	PI 1	PI 2	PI 3	PI 4	PI 5	PI 6	CV (%) ^b	F-valor	p-valor
Coeficiente Angular^a	131,21	142,63	164,05	149,3	171,29	172,08	161,98	10,59	2,06	0,18

^a Média de duas replicatas; ^b coeficiente de variação; $F_{tab} = 3,03$; PI – plasma

➤ Linearidade

As curvas de calibração foram preparadas pela plotagem da área dos picos da glicoformas da $\alpha 1$ -AGP no eixo das ordenadas e concentração das mesmas no eixo das abscissas. As curvas de calibração foram lineares no intervalo de concentração plasmática de 125 a 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de $\alpha 1$ -AGP. A tabela 1.3 apresenta as equações lineares e respectivos coeficientes de correlação linear (r) das curvas analíticas as quatro glicoformas da $\alpha 1$ -AGP. Os valores dos coeficientes de correlação foram superiores a 0,99. A validade estatística dos valores experimentais obtidos para as curvas analíticas foi avaliada pela análise de variância (ANOVA - *Lack of fit*), cujo resultado também é mostrado na tabela 1.3. Estes resultados indicam que não houve desvio de linearidade, pois os valores de p foram maiores do que 0,05 e os valores de F calculados foram menores do que o tabelado (2,55). A análise de variância foi realizada pelo programa estatístico Minitab Release versão 14 (State College, Pennsylvania, EUA).

Tabela 1.3. Linearidade do método

α -1 AGP	Intervalo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação Linear ^a	r^b	ANOVA	
				<i>lack-of-fit</i> ^c	
				F-valor	p-valor
G3	125 - 2.500	$y = 156,01x + 2,46$	0,995	0,77	0,59
G4	125 - 2.500	$y = 313,60x + 21,30$	0,995	1,39	0,29
G5	125 - 2.500	$y = 198,68x + 18,64$	0,993	1,36	0,21
G6	125 - 2.500	$y = 329,60x + 55,43$	0,995	1,90	0,16

^a Curva de calibração analítica foi preparada em quintuplicata para as concentrações 0,125, 0,25, 0,50, 1,00, 1,50 e 2,50 mg mL^{-1} da α -1 AGP; $y = ax + b$, em que y é a resposta do aparelho (área do pico do analito), a é o coeficiente angular, b é o coeficiente linear, e x é a concentração da solução medida em $\mu\text{g mL}^{-1}$. ^b Coeficiente de correlação. ^c $F_{\text{tab}}(0,05) = 2,55$

➤ LQ

Os guias de validação de métodos analíticos, como os propostos pelo ICH, USP e ANVISA, descrevem diferentes modos para a determinação dos limites de detecção e quantificação. Dentre estes incluem a avaliação visual, razão sinal-ruído e o uso de parâmetros da curva de calibração analítica. Neste presente trabalho, o LQ foi baseado no menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis, conforme preconizado pela ANVISA (RDC 27, 2012). Pode ser observado que, para a concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram obtidos valores de precisão (CV, %) e exatidão (ER, %) inferiores a 15 %, adequados e de acordo com os exigidos pela legislação (tabela 1.4).

Tabela 1.4. Limite de Quantificação do método

α -1 AGP	Concentração Nominal	Concentração Obtida	Exatidão	Precisão
	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ER (%) ^a	CV (%) ^b
G3	125	119	-4,71	2,89
G4	125	141	13,09	14,31
G5	125	113	-9,63	12,23
G6	125	128	2,32	9,52

^a ER erro relativo; ^b Coeficiente de variação

➤ Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas pelo cálculo do CV (%) e do ER (%), respectivamente, para cinco determinações das glicoformas da α -1 AGP em cinco níveis de concentração e em cinco dias diferentes sob as mesmas condições de análise. A tabela 1.5 apresenta os valores de precisão e exatidão intra e inter-dias para as análises das glicoformas da α -1 AGP, demonstrando que o método atende as recomendações de guias oficiais de validação.

Tabela 1.5. Precisão e Exatidão do método para análise da α -1 AGP

α -1 AGP	Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Intra-dia ($n = 5$) ^a			Inter-dia ($n = 5$) ^b		
		Concentração Obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV ^c (%)	ER ^d (%)	Concentração Obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV ^c (%)	ER ^d (%)
G3	125	119,12	2,89	-4,70	124,27	11,70	-0,58
	250	279,22	13,66	11,69	256,32	10,44	2,53
	500	493,17	5,22	-1,37	512,13	12,37	2,43
	1.000	1.049,07	9,30	4,91	953,51	4,14	-4,65
	2.500	2.474,28	5,42	-1,03	2507,84	5,48	0,31
G4	125	141,36	14,31	13,09	131,28	11,18	5,03
	250	281,90	12,92	12,76	249,20	14,07	-0,32
	500	518,94	7,75	3,79	513,45	10,94	2,69
	1.000	1.076,57	10,35	7,66	959,94	6,58	-4,01
	2.500	2.469,05	2,47	-1,24	2452,13	4,35	-1,91
G5	125	112,95	12,24	-9,64	119,73	2,40	-4,21
	250	262,30	9,44	4,92	260,00	10,38	4,00
	500	482,96	12,33	-3,41	490,00	9,51	-2,00
	1.000	947,73	13,63	-5,23	919,80	7,01	-8,02
	2.500	2.4578,89	9,25	-1,68	2490,25	4,28	-0,39
G6	125	127,90	9,52	2,32	132,30	7,63	5,84
	250	267,60	14,47	7,04	262,94	5,86	5,17
	500	482,77	12,50	-3,45	512,79	9,72	2,56
	1.000	1.020,95	8,94	2,10	999,50	5,58	-0,05
	2.500	2.424,21	3,62	-3,03	2502,40	7,33	0,08

^a n = número de determinações; ^b n = número de dias; ^c coeficiente de variação; ^d erro relativo

4.3. Análise do Plasma de Pacientes com Seps

A seps é uma síndrome clínica causada em consequência da resposta sistêmica a uma infecção. Visto que a maioria dos eventos fisiopatológicos ocorridos durante a seps são provenientes de uma reação exacerbada ou de uma resposta inflamatória não controlada (MESTRINER et al., 2007), qualquer contribuição para a compreensão desta síndrome é importante. Desta forma, o método validado no presente trabalho foi aplicado em um estudo-piloto para a avaliação de possíveis diferenças na concentração plasmática das glicoformas da $\alpha 1$ -AGP em plasma de pacientes sépticos (figura 1.7).

Figura 1.7. Eletroferograma de plasma de voluntário sadio (A), paciente com sepse grave (B) e choque séptico (C). Condições de análise *vide* figura 1.6.

Uma vez que dados da literatura tem demonstrado um aumento na concentração total de $\alpha 1$ -AGP (KAKEHI et al., 2001; MESTRINER et al., 2007), bem como uma mudança na estrutura dos glicosídeos ligados a esta proteína (GORNIK et al., 2007) no plasma de paciente séptico, foi realizado, a partir do método validado para 4 glicoformas da proteína, o cálculo da concentração para cada uma delas. Pode ser observado, pelos dados apresentados na tabela 1.6, que a concentração de cada glicoforma apresenta-se elevada nos pacientes com sepse em relação ao controle (voluntário sadio). Isto também pode ser observado na figura 1.7, referente aos eletroferogramas de amostras de plasma de voluntário sadio e pacientes com sepse grave e choque séptico, respectivamente. Além disso, também pode ser observada uma diferença nas concentrações entre as glicoformas dos pacientes.

Tabela 1.6. Determinação da concentração plasmática das glicoformas da $\alpha 1$ -AGP de pacientes com sepse

Paciente	Glicoformas* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	G3	G4	G5	G6
18	1214,22	927,14	1035,17	990,59
22	559,41	500,66	805,91	1002,91
43	501,76	360,25	417,42	287,66
47	663,10	365,05	511,18	609,42
51	945,22	643,65	702,79	620,82

* Concentração de cada glicoforma da $\alpha 1$ -AGP em plasma humano normal = $300,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ (n = 5; CV = 9,43 %)

As diferenças nas glicoformas corrobora a hipótese da regulação diferenciada da glicosilação e da taxa de síntese da glicoproteína, como previamente postulado por Fassbender et al. (1991), e mostrado por outros autores, como Kazmierczak et al. (1995), que observaram mudanças na glicosilação da $\alpha 1$ -AGP em pacientes que sofreram infarte agudo do miocárdio. Além destes, Ryden et al.(2002) e Saroha et al. (2011), demonstraram uma diferença na glicosilação da $\alpha 1$ -AGP em pacientes com artrite reumatóide e Brinkman-van der Linden et al. (1996), demonstraram uma diminuição na glicosilação da $\alpha 1$ -AGP em ratos tratados oralmente com o hormônio estrogênio, desta forma ações inflamatórias dependentes de glicosilação da $\alpha 1$ -AGP podem se moduladas.

Estas alterações na glicosilação pode ter implicações em algumas funções da $\alpha 1$ -AGP, como seu efeito inibitório sobre a proliferação de linfócitos, assim como, na indução da IL-1 (BRINKMAN-VAN DER LINDEN, 1996). Embora estes valores não tenham sido

estatisticamente justificados, quando associados ao escore APACHE II, podem servir como um importante preditor de gravidade da doença. Além disso, podemos sugerir que o bloqueio de enzimas responsáveis pela glicoconjugação (sialiltransferase, fucililtransferase e sialil Lewis X transferase) pode vir a ser um alvo farmacológico relevante na terapêutica de pacientes com sepse.

5. COMENTÁRIOS FINAIS

Foi desenvolvido e validado um método para análise da α 1-AGP, um biomarcador de processos inflamatórios, em amostras de plasma. A condição analítica otimizada possibilitou a separação de 8 (oito) glicoformas da proteína em 50 (cinquenta) min, com resolução de 1,5 e com desempenho analítico, em relação aos parâmetros seletividade, estabilidade, linearidade, LQ, precisão e exatidão, com valores no intervalo recomendado, sendo este o primeiro método validado por CE, descrito na literatura, para análise de diferentes glicoformas desta proteína de forma individual em pacientes com sepse. Foi possível a quantificação das diferentes glicoformas encontradas no plasma de pacientes com sepse fornecendo valores confiáveis para que estudos farmacológicos adicionais possam ser feitos.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALTRIA, K. D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications**. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc., 1996. 349.

ALVES, J. C. et al. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v. 30, p. 3-9, 2008. ISSN 1073-2322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000259420600002 >.

_____. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nature Medicine**, v. 16, n. 6, p. 708-U113, Jun 2010. ISSN 1078-8956. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278394200038 >

ALVES-FILHO, J. C. et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med**, v. 34, n. 2, p. 461-70, Feb 2006. ISSN 0090-3493 (Print). Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16424729 >.

ARNOLD, F. J.; MEYERSON, L. R. Radial immunodiffusion assay for rat alpha-1-acid glycoprotein. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 37, n. 3, p. 485-491, Nov 1990. ISSN 0091-3057. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990EL11300017 >.

ASADUZZAMAN, M. et al. LFA-1 and MAC-1 mediate pulmonary recruitment of neutrophils and tissue damage in abdominal sepsis. **Shock**, v. 30, n. 3, p. 254-9, Sep 2008. ISSN 1540-0514 (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18197144 >.

BONE, R. C.; SIBBALD, W. J.; SPRUNG, C. L. The accp-sccm consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1481-1482, Jun 1992a. ISSN 0012-3692. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992HX70800001 >.

_____. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1481-3, Jun 1992b. ISSN 0012-3692 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1600757 >.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Genéricos-Legislação-Resolução-RE. no. 27, de 17 de maio de 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 4 de Julho de 2012.

BRINKMAN-VAN DER LINDEN, E. C. M. et al. Oral estrogen treatment induces a decrease in expression of sialyl Lewis x on alpha(1)-acid glycoprotein in females and male-to-female transsexuals. **Glycobiology**, v. 6, n. 4, p. 407-412, Jun 1996. ISSN 0959-6658. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UX82900014 >.

BROOKS, S. A. Strategies for Analysis of the Glycosylation of Proteins: Current Status and Future Perspectives. **Molecular Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 76-88, Sep 2009. ISSN 1073-6085. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000269205900010 >.

CASTRIOTA, G. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists inhibit adipocyte expression of alpha 1-acid glycoprotein. **Cell Biology International**, v. 31, n. 6, p. 586-591, Jun 2007. ISSN 1065-6995. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246663300008 >.

CECILIANI, F.; POCACQUA, V. The acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein: A model for altered glycosylation during diseases. **Current Protein & Peptide Science**, v. 8, n. 1, p. 91-108, Feb 2007. ISSN 1389-2037. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243632700009 >.

CLAPPERTON, M. et al. The association between plasma levels of acute phase proteins, haptoglobin, alpha-1 acid glycoprotein (AGP), Pig-MAP, transthyretin and serum amyloid A (SAA) in Large White and Meishan pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 119, n. 3-4, p. 303-309, Oct 2007. ISSN 0165-2427. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250022200015 >.

COLOMBO, S. et al. Orosomucoid (alpha(1)-acid glycoprotein) plasma concentration and genetic variants: Effects on human immunodeficiency virus protease inhibitor clearance and cellular accumulation. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, n. 4, p. 307-318, Oct 2006. ISSN 0009-9236. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241210300001 >.

DOLNIK, V. Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007. **Electrophoresis**, v. 29, n. 1, p. 143-156, Jan 2008. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000252826500013 >.

ELPHICK, G. F. et al. Recombinant human activated protein C inhibits integrin-mediated neutrophil migration. **Blood**, Feb 24 2009. ISSN 1528-0020 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19244161 >.

FASSBENDER, K. et al. Glycosylation of alpha-1-acid glycoprotein in relation to duration of disease in acute and chronic infection and inflammation. **Clinica Chimica Acta**, v. 203, n. 2-3, p. 315-328, Dec 1991. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991GY52900022 >.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, Nov 2003. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000186851900005 >.

FOURNIER, T.; MEDJOUBI-N, N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1482, n. 1-2, p. 157-171, Oct 2000. ISSN 0167-4838. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165551800017 >.

GORNIK, O. et al. Changes of serum glycans during sepsis and acute pancreatitis. **Glycobiology**, v. 17, n. 12, p. 1321-1332, Dec 2007. ISSN 0959-6658. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000251035900004 >.

HEUERTZ, R. M. et al. C-reactive protein inhibits chemotactic peptide-induced p38 mitogen-activated protein kinase activity and human neutrophil movement. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 25, p. 17968-17974, Jun 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000080974300081 >.

HOCHEPIED, T. et al. alpha(1)-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 1, p. 25-34, Feb 2003. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180696000004 >.

JEAN-BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 22, n. 2, p. 10, 2007.

JOYCE, D. E.; NELSON, D. R.; GRINNELL, B. W. Leukocyte and endothelial cell interactions in sepsis: Relevance of the protein C pathway. **Critical Care Medicine**, v. 32, n. 5, p. S280-S286, May 2004. ISSN 0090-3493. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221694300016 >.

KAKEHI, K. et al. Capillary electrophoresis of sialic acid-containing glycoprotein. Effect of the heterogeneity of carbohydrate chains on glycoform separation using an alpha(1)-acid glycoprotein as a model. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 11, p. 2640-2647, Jun 2001. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000169063000049 >.

KAZMIERCZAK, M. et al. Changes of acute-phase proteins glycosylation profile as a possible prognostic marker in myocardial-infarction. **International Journal of Cardiology**, v. 49, n. 3, p. 201-207, May 1995. ISSN 0167-5273. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995RA03400002 >.

KINOSHITA, M. et al. Comparative studies on the analysis of glycosylation heterogeneity of sialic acid-containing glycoproteins using capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 866, n. 2, p. 261-271, Jan 2000. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000084778200011 >.

KONG, X. Y. et al. An immunocompromised BALB/c mouse model for respiratory syncytial virus infection. **Virology Journal**, v. 2, 2005. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000208519000003 >.

LACUNZA, I. et al. CZE of human alpha-1-acid glycoprotein for qualitative and quantitative comparison of samples from different pathological conditions. **Electrophoresis**, v. 27, n. 21, p. 4205-4214, Nov 2006. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242222500011 >.

LE COUTRE, P. et al. Determination of alpha-1 acid glycoprotein in patients with Ph plus chronic myeloid leukemia during the first 13 weeks of therapy with STI571. **Blood Cells Molecules and Diseases**, v. 28, n. 1, p. 75-85, Jan-Feb 2002. ISSN 1079-9796. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175176700010 >.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Med**, v. 29, n. 4, p. 530-8, Apr 2003. ISSN 0342-4642 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12664219 >.

LIANG, X. Y. et al. Hemopexin down-regulates LPS-induced proinflammatory cytokines from macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 2, p. 229-235, Aug 2009. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268454900006 >.

MALAWISTA, S. E.; MONTGOMERY, R. R.; VAN BLARICOM, G. Evidence for reactive nitrogen intermediates in killing of staphylococci by human neutrophil cytoplasts. A new microbicidal pathway for polymorphonuclear leukocytes. **J Clin Invest**, v. 90, n. 2, p. 631-6, Aug 1992. ISSN 0021-9738 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1379614 >.

MATSUMOTO, K. et al. alpha(1)-Acid glycoprotein suppresses rat acute inflammatory paw edema through the inhibition of neutrophils activation and prostaglandin E-2 generation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 7, p. 1226-1230, Jul 2007. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248712000008 >.

MESTRINER, F. et al. Acute-phase protein alpha-1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19595-19600, Dec 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000251525800076 >.

MONKHOUSE, D. Focus on: considerations during the postoperative period - Postoperative sepsis. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 17, p. 6, 2006.

NASCIMENTO, D. C. et al. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 38, n. 8, p. 1718-1725, Aug 2010. ISSN 0090-3493. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280116500012 >.

OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 855-867, Sep 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240675000014 >.

ONGAY, S. et al. Development of a fast and simple immunochromatographic method to purify alpha 1-acid glycoprotein from serum for analysis of its isoforms by capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 663, n. 2, p. 206-212, Mar 2010. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276010500013 >.

OZTURK, E. et al. Does leflunomide attenuate the sepsis-induced acute lung injury? **Pediatr Surg Int**, v. 24, n. 8, p. 899-905, Aug 2008. ISSN 0179-0358 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18516612 >.

PALTRINIERI, S. et al. Serum alpha 1-acid glycoprotein (AGP) concentration in non-symptomatic cats with feline coronavirus (FCoV) infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, n. 4, p. 271-277, Aug 2007. ISSN 1098-612X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248508600004 >.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, n. 2, p. 163-187, Mar-Apr 2004. ISSN 0928-4249. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221761500002 >.

RYDEN, I. et al. Fucosylation of alpha 1-acid glycoprotein (orosomucoid) compared with traditional biochemical markers of inflammation in recent onset rheumatoid arthritis. **Clinica Chimica Acta**, v. 317, n. 1-2, p. 221-229, Mar 2002. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173895900027 >.

SAROHA, A. et al. Altered glycosylation and expression of plasma alpha-1-acid glycoprotein and haptoglobin in rheumatoid arthritis. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 20, p. 1839-1843, Jun 2011. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292177100019 >.

SCHONFELD, D. L. et al. The 1.8-angstrom Crystal Structure of alpha(1)-Acid Glycoprotein (Orosomucoid) Solved by UV RIP Reveals the Broad Drug-Binding Activity of This Human Plasma Lipocalin. **Journal of Molecular Biology**, v. 384, n. 2, p. 393-405, Dec 2008. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261272500008 >.

SCIRE, A. et al. Fibrillation properties of human alpha(1)-acid glycoprotein. **Biochimie**, v. 95, n. 2, p. 158-166, Feb 2013. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315614200005 >.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 197-223, 2005. ISSN 0732-0582 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15771570 >.

SEI, K. et al. Collection of alpha(1)-acid glycoprotein molecular species by capillary electrophoresis and the analysis of their molecular masses and carbohydrate chains - Basic studies on the analysis of glycoprotein glycoforms. **Journal of Chromatography A**, v. 958, n. 1-2, p. 273-281, Jun 2002. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000176487000026 >.

SHAH, V. P. et al. Bionalytical method validation – A revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**, v. 17, p. 7, 2000.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. R251-R260, Aug 2004. ISSN 1466-609X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223304600014 >.

SLUZEWSKA, A. et al. Concentration and microheterogeneity glycoforms of alpha-1-acid glycoprotein in major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 39, n. 2, p. 149-155, Jul 1996. ISSN 0165-0327. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UX84600010 >.

STUMPE, M. et al. High-performance liquid chromatography determination of alpha 1-acid glycoprotein in small volumes of plasma from neonates. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 831, n. 1-2, p. 81-84, Feb 2006. ISSN 1570-0232. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000235263800012 >.

TILG, H. et al. Antiinflammatory properties of hepatic acute-phase proteins - preferential induction of interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist over il-1-beta synthesis by human peripheral-blood mononuclear-cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 5, p. 1629-1636, Nov 1993. ISSN 0022-1007. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993MD95300017 >.

United States of American. Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001.

WEINBERGER, R. Capillary Zone Electrophoresis Basic Concepts. In: WEINBERGER, R. (Ed.). **Practical Capillary Electrophoresis**. Second. USA: Academic Press, 2000. cap. 2, p.25-72. ISBN 978-0127423562.

YAMASHIRO, K. et al. Inhibitory effects of antithrombin III against leukocyte rolling and infiltration during endotoxin-induced uveitis in rats. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, n. 7, p. 1553-1560, Jun 2001. ISSN 0146-0404. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000169024000022 >.

YU, B. et al. Separation and detection of erythropoietin by CE and CE-MS. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 350-357, Apr 2005. ISSN 0165-9936. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228507000019 >.

ZHANG, F. et al. Glutamine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Nutrition**, Mar 13 2009. ISSN 0899-9007 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19286350 >.

***CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E
VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE
DO BIOFÁRMACO INTERFERON ALFA-2 α
(IFN α -2 α) POR ELETROFORESE CAPILAR***

---

1. INTRODUÇÃO

Os interferons (IFN) são citocinas largamente expressadas, ou seja, proteínas secretadas por células da imunidade inata e adaptativa, que medeiam muitas das funções celulares. Os IFNs foram originalmente descobertos por causa de suas habilidades de proteger células contra infecções virais. Vários tipos de IFNs têm sido identificados e caracterizados, dentre eles encontram-se os IFN tipo I (IFN- α/β) e o tipo II (IFN- γ) (SANTANA et al., 1999; ABBAS; LICHTMAN, 2005; PLATANIAS, 2005).

As principais propriedades dos IFNs são sua atividade antiviral, efeito no controle da proliferação celular e na modulação do sistema imune (SANTANA et al., 1999; STUBGEN, 2009). Estes efeitos são devido principalmente à capacidade do IFN de promover a expressão, nas células T, de receptores funcionais para a principal citocina indutora de resposta TH1, a IL-12 (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os IFNs podem interferir em quase todas as etapas da invasão viral e, se a célula já estiver infectada por vírus, os IFNs induzem o aumento da citólise mediada por células *Natural Killer* (NK). Possuem ainda atividade anti-proliferativa, que inibe o crescimento de muitos tipos celulares e assim controlam a expansão de células cancerosas e infectadas (ABBAS; LICHTMAN, 2005; STUBGEN, 2009). Estas características sugerem que os IFNs produzidos naturalmente e os IFNs recombinantes podem ser úteis como potenciais agentes anticâncer, na terapia de viroses e neoplasias, além de outras condições adversas (PHILLIPS; DICKENS, 1998; SANTANA et al., 1999).

➤ Interferon α

IFN- α é uma família de proteínas espécie-específica altamente homologas e, ocasionalmente são glicosiladas, sendo produzidas principalmente por leucócitos (ABBAS; LICHTMAN, 2005; THITINAN; McCONVILLE, 2009).

Como a família de IFN- α é degradada pelo ácido gástrico e por enzimas proteolíticas, sua administração deve ser por via parenteral, em que o tempo para a concentração máxima ($T_{\max}$) é 3,8 h para dose intramuscular. O IFN- α é largamente e rapidamente distribuído pelo corpo após administração, com maiores concentrações ocorrendo no baço, rim, fígado e pulmão, sendo a principal rota de eliminação o catabolismo renal e quantidade negligenciável é excretada na urina, na forma intacta, enquanto os metabolismos hepático e biliar são as menores vias de eliminação (BETHESDA, 2007).

O IFN- α limita a expansão de vírus durante infecções por mecanismos diretos, levando a indução de um estado antiviral que protege a célula de infecções ou atenua a proliferação de células já infectadas, e por mecanismos indiretos leva a ativação de resposta imune adaptativa, como a proliferação e maturação de células NK (DAVIS; KRAWCZYNSKI; SZABO, 2007; STUBGEN, 2009). O IFN- α tem sido aprovado pelo FDA como um biofármaco para tratamento de infecções virais como hepatites B e C crônicas; leucemia mieloide crônica; mielomas múltiplos e carcinoma de células renais (BACCARANI et al., 2003; DE BRUIJNE et al., 2009; THITINAN; McCONVILLE, 2009).

Três tipos de IFN- α são conhecidos, 2a, 2b, e n1. Entre estes, 2a e 2b são formas recombinantes, enquanto que o IFN-n1, chamado linfoblastóide, é natural e é produzido em culturas de linfoblasto (BARONE et al., 2004).

O IFN α -2a (figura 2.1) tem 165 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 19,2 kDa. IFN α -2a é constituído, na estrutura secundária, por alfa hélices (65 % de alfa helicoidal), com um pI variando de 5,5 a 7,0 (CRAIG et al., 1995; KLAUS et al., 1997).

Figura 2.1. Representação esquemática do IFN α -2a. Adaptado de Klaus et al. (1997).

O IFN α -2a é empregado no tratamento de vários tipos de câncer e, em combinação com a ribavirina, é atualmente o tratamento mais comum para a infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV).

No entanto, o desenvolvimento de biofármacos requer tecnologia analítica que possa detectar e quantificá-los de forma adequada. Sendo necessário utilizar diferentes técnicas para se obter uma completa compreensão do produto, pois estes apresentam uma inerente heterogeneidade, que está presente na classe de biofármacos (RACAITYTE; KIESSIG; KALMAN, 2005; OLIVA; FARINA; LLABRES, 2007; STAUB et al., 2011). Dessa forma, para a avaliação da qualidade e quantidade em todas as fases de pesquisa e desenvolvimento é, geralmente, necessário o uso de métodos cromatográficos e eletroforéticos (SEEDS;

GORDON; MILLER, 2009; LACHER et al., 2010; STAUB et al., 2011). A maior parte dos métodos comumente utilizados para a análise de IFN α -2a é baseada em bioensaio (SEEDS; GORDON; MILLER, 2009), imunoensaio (JUSTA et al., 2010), focalização isoelétrica em gel (HUANG et al., 2007), técnicas de eletroforese em gel (REIMER; SCHWEIZER; JUNGI, 2007), os quais apresentam certas limitações, incluindo a complexidade e elevado consumo de tempo no desenvolvimento do ensaio, quantidades relativamente grandes de amostra são necessária para alcançar um nível aceitável de sensibilidade e elevado grau de variabilidade nos ensaios (CHAVES et al., 2011) e em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC-RP), apresentando grande tempo de análise (DA SILVA et al., 2009) e elevado consumo de solvente orgânico (CHAVES et al., 2011).

Neste contexto, foi avaliada a eletroforese capilar, uma técnica complementar a cromatografia, para a análise de formulações farmacêuticas de IFN α -2a. A CE tem provado ser uma técnica eficaz de separação de proteínas e peptídeos (GENNARO; SALAS-SOLANO; MA, *et al.*, 2006; DOLNIK, 2008), por apresentar vantagens como: simplicidade, alta eficiência, versatilidade, análise rápida, alta resolução, pequeno volume de amostra e baixo custo operacional (VESPALEC; BOCEK, 1999; TANAKA; TERABE, 2001).

2. OBJETIVOS

Os objetivos desta etapa foram:

- Otimizar as condições para análise do IFN α -2a por eletroforese capilar;
- Validar o método otimizado para análise do IFN α -2a por eletroforese capilar;
- Aplicar o método desenvolvido e validado em formulação farmacêutica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes e Soluções

O padrão de IFN α -2a recombinante humano (pureza de 95 % - SDS-PAGE e HPLC) e o dodecilsulfato de sódio (SDS) foram obtidos da Sigma Aldrich (Missouri, EUA). Para análise do IFN α -2a foi preparada uma solução estoque, em água ultrapura, na concentração de 2,03 MUI mL⁻¹. A solução foi estocada em tubo de vidro âmbar sob refrigeração a 4 ± 1 °C.

Para a otimização das condições de análise do IFN α -2a foram utilizados os seguintes reagentes: tetraborato de sódio decaidratado (Merck, California, EUA), ácido bórico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, cloreto de lítio, ácido clorídrico (Synth, São Paulo, Brasil) e hidróxido de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). As soluções de trabalho de IFN α -2a utilizadas durante a etapa de validação do método foram preparadas diariamente por diluição da solução estoque com água ultrapura nas concentrações de 0,41, 0,58, 0,78, 1,17 e 1,57 MUI mL⁻¹. As soluções foram estocadas em tubos de vidro âmbar sob refrigeração a 4 ± 1 °C.

Todas as soluções foram filtradas em dispositivos filtrantes confeccionados em PVDF de 0,45 µm de porosidade (Millipore, Massachusetts, EUA) antes do uso e a água utilizada no preparo dos eletrólitos de corrida e na lavagem do capilar foi água ultrapura (Millipore, Massachusetts, EUA). Os componentes empregados no preparo do eletrólito de corrida foram pesados em balança analítica modelo CP224S (Sartorius, New York, EUA). Para degaseificação das soluções empregou-se um aparelho de ultra-som modelo Q3350 (Quimis, São Paulo, Brasil). O eletrólito de corrida foi preparado pesando-se quantidades adequadas dos reagentes, dissolvendo-os em água ultrapura e ajustando-se o pH pela adição de solução de HCl (1 mol L⁻¹) ou de NaOH (1 mol L⁻¹), conforme a necessidade.

3.2. Equipamento e condicionamento do capilar

Nas análises do IFN α -2a foi empregado um equipamento de CE modelo P/ACE MDQ (Beckman Coulter, California, EUA) acoplado a um detector de arranjo de diodos, operando a 200 nm. Foi utilizado o *software* 32 Karat versão 8.0 para controle, aquisição e tratamento dos dados. As injeções foram realizadas por um injetor automático.

O capilar de sílica fundida, revestido externamente por uma camada de poliimida, foi adquirido em rolos de 25 m (Microsolv, New Jersey, EUA). Foi utilizado capilar com 75 μm de diâmetro interno, 61 cm de comprimento total e 50 cm de comprimento efetivo. A janela óptica de detecção ($\approx 0,5$ cm de comprimento) foi construída pela remoção do revestimento de poliimida a 11 cm de uma das extremidades do capilar, através da aplicação de calor. A poliimida queimada foi removida com o auxílio de um algodão embebido em acetona (Mallinckrodt, Kentucky, EUA).

Antes do primeiro uso, os capilares novos foram condicionados por lavagem com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ durante 30 min e água ultrapura durante 30 min. No início de cada dia, o capilar era condicionado com uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹ durante 10 min, seguido de uma etapa de lavagem com água ultrapura por 10 min e uma terceira etapa com o eletrólito de corrida durante os mesmos 10 min. Entre as análises o capilar era condicionado por 3 min com NaOH 0,1 mol L⁻¹, 3 min com água ultrapura e 3 min com o eletrólito de corrida. Ao final das análises, o capilar era lavado com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 15 min, seguido por uma etapa de lavagem com água ultrapura por 15 min. Durante o armazenamento, as extremidades do capilar permaneceram imersas em água ultrapura.

3.3. Otimização das condições analíticas

Durante os experimentos para o desenvolvimento e a otimização do método foi utilizada solução de IFN α -2a na concentração de 0,9 MUI mL⁻¹, um capilar de sílica fundida não revestido internamente com diâmetro interno de 75 μm e 50 cm de comprimento efetivo, tensão de 20 kV (modo positivo), temperatura de $20 \pm 0,5$ °C, comprimento de onda de 200 nm e injeção hidrodinâmica a 0,5 psi por 10 s.

➤ Influência do tipo e concentração da solução de eletrólitos

Diferentes tipos de tampão foram avaliados nas análises do IFN α -2a: tampão fosfato de sódio 100 mmol L⁻¹, com valores de pH de 4,5, 7,4 e 8,0; tampão borato de sódio 100 mmol L⁻¹, com valores de pH variando de 8,0 a 9,5 e tampão borato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 8,5 com aditivos, como o cloreto de lítio 25 mmol L⁻¹ e SDS 50 mmol L⁻¹.

➤ Influência da concentração de SDS

O efeito da concentração do SDS nas análises do IFN α -2a foi avaliada nas concentrações de 10, 30 e 50 mmol L⁻¹, mantendo-se o pH em 8,5 e a concentração do tampão borato de sódio em 50 mmol L⁻¹.

➤ Influência da concentração do Tampão

O efeito da concentração do tampão borato de sódio (30, 50, 100 e 150 mmol L⁻¹) nas análises do IFN α -2a foi avaliada mantendo-se o pH em 8,5 e a concentração de SDS em 50 mmol L⁻¹. As concentrações do tampão foram preparadas pela mistura de quantidades apropriadas de tetraborato de sódio decaidratado e ácido bórico.

➤ Influência da temperatura e tensão

A fim de determinar a temperatura ótima para a análise do IFN α -2a, corridas eletroforéticas em diferentes temperaturas (15, 20 e 25 °C) foram realizadas. O efeito da tensão sobre o tempo de migração foi avaliado a 20, 25 e 30 kV.

3.4. Validação do Método

Para a análise do IFN α -2a, o método foi validado empregando-se soluções padrão. O teste de *system suitability* foi realizado antes de iniciar a validação. Os seguintes parâmetros foram avaliados: estabilidade, linearidade, limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez, seguindo as diretrizes da Resolução 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), da farmacopéia Norte Americana - United States Pharmacopeia (USP - 2009) e do ICH - 1996.

➤ *System suitability*

O teste de *system suitability* foi realizado para avaliar a reprodutibilidade do sistema e verificar se é adequado ao fim proposto. Assim, foram realizadas análises em seis replicatas da solução-padrão na concentração de 0,41 MUI mL⁻¹ IFN α -2a.

➤ Estabilidade

Para realizar o teste de estabilidade de curta duração da amostra, soluções de 0,90 e 0,41 MUI mL⁻¹ de IFN α -2a foram preparadas em água (análise em quadruplicata) e armazenadas em frascos âmbar à temperatura ambiente pelo período de 12 h e analisadas. As respostas para as soluções mantidas nas condições do teste foram analisadas e comparadas com uma solução padrão recentemente preparada. Os dados relativos aos estudos de estabilidade foram submetidos ao teste *t* de *Student*, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Para realização da análise estatística foi usado o programa Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad, California, EUA).

Os testes de estabilidade de longa duração (amostras congeladas por um período não inferior a 7 dias) e ciclos de congelamento e descongelamento não foram realizados mediante informação prévia do fabricante de que esta proteína não é estável a processos de congelamento e descongelamento.

➤ Seletividade

Em geral, uma forma simples de verificar a seletividade de um método é observar a presença de picos interferentes co-migrando no tempo de migração do analito de interesse ou próximo a ele. Para isto, é realizada a análise de uma amostra branca (matriz isenta do fármaco). Assim, a seletividade foi avaliada pela análise de uma amostra do branco (excipientes), constituída por 3,60 mg de cloreto de sódio; 0,10 mg de polissorbato 80; 5,00 mg de álcool benzílico e 0,38 mg de acetato de amônio (conforme descrito pelo fabricante). A amostra do branco foi analisada e os dados foram comparados com os resultados obtidos na análise de uma solução contendo apenas o IFN α -2a (0,90 MUI mL⁻¹), e com uma amostra dos excipientes da formulação fortificado com solução padrão de IFN α -2a (0,90 MUI mL⁻¹).

➤ Linearidade

A linearidade do método foi determinada pela construção do gráfico de calibração com cinco níveis de concentração de IFN α -2a abrangendo a faixa 0,41 a 1,57 MUI mL⁻¹. Triplicatas das soluções-padrão foram feitas e a altura dos picos dos eletroferogramas foi plotada contra a concentração do biofármaco para obter uma curva de calibração analítica

correspondente. Os dados foram então submetidos à análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados para calcular a equação de calibração e o coeficiente de correlação (r).

➤ LQ

A detectabilidade do método foi avaliada pela determinação do LQ, definido como a menor concentração que pode ser determinada com precisão e exatidão inferiores a 5 % (ANVISA, 2003). Para esta determinação, 5 amostras foram preparadas na concentração de 0,41 MUI mL⁻¹ de IFN α -2a e as concentrações foram calculadas com base em uma curva analítica preparada simultaneamente, na faixa de concentração de 0,41 a 1,57 MUI mL⁻¹.

➤ Precisão e Exatidão

A precisão do método foi determinada por estudos de precisão intra-dia e precisão inter-dia. A precisão intra-dia foi determinada pela análise das amostras em três diferentes concentrações de IFN α -2a (0,41, 0,78 e 1,57 MUI mL⁻¹) em triplicata, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. Precisão inter-dia do método foi avaliada através da realização da análise em seis replicatas de cada concentração em dois dias diferentes.

➤ Robustez

Robustez, ou seja, a medida da capacidade do método de permanecer inalterado por pequenas mudanças deliberadas nas condições eletroforéticas foi estudada para soluções padrão de IFN α -2a, analisando-as em condições ligeiramente alteradas a partir do método definido. O teste de robustez foi avaliado usando um procedimento de delineamento experimental. O procedimento escolhido foi um modelamento fatorial em 2 níveis 2⁴⁻¹ (oito experimentos) realizado pela seleção de quatro fatores: concentração de SDS, valor de pH, temperatura de capilar e tensão em estudos a dois níveis: alto e baixo. Os fatores e seus níveis avaliados neste estudo são apresentados na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Variáveis selecionadas como fatores e valores escolhidos como níveis para avaliação da robustez do método

Fatores	Valor ótimo	Nível Baixo	Nível Alto
pH da solução Tampão	8,5	8,3	8,7
Concentração de SDS (mmol L ⁻¹)	50	45	55
Tensão (kV)	25	23	27
Temperatura do Capilar (°C)	20,0	15,0	25,0

3.5. Análise de IFN α -2a em Formulação Farmacêutica

Para a quantificação de IFN α -2a na formulação farmacêutica, adquiridas no comércio local com quantidade declarada pelo fabricante de 3 ou 9 MUI por 0,5 mL, foram filtradas e concentradas com a utilização de dispositivo de filtração para centrífuga com uma membrana de 10 kDa de poro, modelo Amicon Ultra-4 (Millipore, Massachusetts, EUA). Este procedimento de filtração foi realizado para remover o excesso de sal da formulação, a qual é composta por 3,60 mg de cloreto de sódio, 0,10 mg de polissorbato 80, 5,00 mg de álcool benzílico (agente conservante), e 0,38 mg de acetato de amônio. Após este procedimento, a solução concentrada de IFN α -2a foi diluída para a concentração de 0,90 MUI mL⁻¹, com água ultrapura. Cinco amostras de cada formulação (3 ou 9 MUI 0,5 mL⁻¹) foram preparadas individualmente e injetadas. Este procedimento foi realizado em dois dias consecutivos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do método

A escolha do eletrólito de corrida adequado é importante, pois este deve ter a capacidade de manter o pH constante ao longo da análise, uma vez que o EOF e a mobilidade dos íons são sensíveis a variações de pH (ALTRIA, 1996; WEINBERGER, 2000). Assim, diferentes eletrólitos foram testados, de modo a se obter o melhor resultado, em termos de eficiência e tempo de migração para a análise do IFN α -2a.

O valor de pH da solução tampão deve ser escolhido de tal modo que os analitos apresentem diferenças nas cargas. No entanto, para a separação de proteínas este valor não deve ser muito próximo ao pI, mas pelo menos 1 ou 2 unidades de pH acima ou abaixo deste, pois a solubilidade das proteínas é reduzida perto do seu pI (WATZIG; DEGENHARDT; KUNKEL, 1998).

Assim, inicialmente foi avaliado o tampão fosfato de sódio 100 mmol L⁻¹, em valores de pH de 4,5; 7,4 e 8,0. Porém, como se observa na figura 2.2, não foi possível a análise do IFN α -2a, provavelmente devido a fatores como a adsorção da proteína na parede interna do capilar ou interação do tampão fosfato com a proteína (LAUER; MCMANIGILL, 1986; CRAIG et al., 1995).

Figura 2.2. Eletroferogramas mostrando a análise do IFN α -2a em solução tampão fosfato de sódio 100 mmol L⁻¹ com diferentes valores de pH (A – 4,5; B – 7,4; C – 8,0). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 75 μ m e 50 cm de comprimento efetivo, tensão de 20 kV (modo positivo), Temp. 20 °C e injeção hidrodinâmica a 0,5 psi por 10 s.

Assim, uma alteração no tipo de tampão foi proposta, sendo testado tampão tetraborato de sódio 100 mmol L⁻¹ em solução alcalina, com valores de pH de 8,5; 9,0 e 9,5. Ao serem realizados os primeiros experimentos, com este novo eletrólito de corrida, foi observado o aparecimento de um pico irregular com tempo de migração de 5 min (figura 2.3A). Além disso, foi observado que quando o valor do pH da solução foi aumentado, mantendo-se constante a concentração do eletrólito, houve um aumento na intensidade deste pico bem como um aumento no seu tempo de migração, para aproximadamente 7 min (figura 2.3B e C). Estes resultados podem ser explicados pela redução na interação da proteína com a parede do capilar, assim como pelo aumento da carga líquida negativa da proteína em valor de pH maior do que o seu pI (LAUER; MCMANIGILL, 1986; WATZIG; DEGENHARDT; KUNKEL, 1998). Valores de pH superiores não foram testados pois poderiam causar a hidrólise da proteína.

Figura 2.3. Eletroferogramas mostrando a análise do IFN α -2a em solução tampão tetraborato de sódio 100 mmol L^{-1} com diferentes valores de pH (A – 8,5; B – 9,0; C – 9,5). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com diâmetro interno de $75 \text{ }\mu\text{m}$ e 50 cm de comprimento efetivo, tensão de 20 kV (modo positivo), Temp. de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e injeção hidrodinâmica a 0,5 psi por 10 s.

Diante destes resultados obtidos, foi avaliado o uso de aditivos na solução de eletrólitos. Esta é uma prática comum e indicada para alterar a mobilidade do soluto, modificar o EOF, solubilizar solutos ou compostos na matriz da amostra e reduzir a interação de certos solutos com a parede do capilar (minimizar adsorção) (TAVARES, 1997).

O primeiro aditivo utilizado foi o cloreto de lítio (LiCl), na concentração de 25 mmol L^{-1} em solução tampão tetraborato de sódio 50 mmol L^{-1} e valor de pH de 8,5, conforme mencionado por Guzman et al. (1991). O Li^{+} tem sido utilizado para estabilizar estruturas terciárias de algumas proteínas em solução (GUZMAN et al., 1992), assim como para reduzir a adsorção de proteínas na parede do capilar (LI, 1992; WATZIG; DEGENHARDT; KUNKEL, 1998). Entretanto, com o uso deste aditivo não foi possível obter uma análise considerada satisfatória, apresentando um pico de baixa intensidade e de base larga (figura 2.4A).

Os tensoativos são incorporados na solução de eletrólito para minimizar as interações da proteína com a parede do capilar e controlar o EOF. Além disto, o tensoativo pode formar um complexo com a proteína (complexo proteína-tensoativo), podendo modificar as mobilidades eletroforéticas entre as diferentes proteínas (CORRADINI, 1997). Baseado nos trabalhos de Donges et al. (2001), Jing, Kaneta e Imasaka (2005) e Al-Ghobashy et al. (2011), foi avaliado o SDS, um tensoativo aniônico, na concentração de 50 mmol L^{-1} em solução tampão tetraborato de sódio 50 mmol L^{-1} e pH de 8,5. Em presença de SDS foi observada

uma melhora significativa na análise do IFN α -2a, porém, um aumento no tempo de migração foi observado (figura 2.4B). Assim, foi selecionado o tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ e pH de 8,5, com adição de 50 mmol L⁻¹ de SDS, para a otimização do método de análise.

Figura 2.4. Eletroferogramas mostrando a análise do IFN α -2a em solução tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ com valor de pH de 8,5 com adição de aditivos (A – 25 mmol L⁻¹ de LiCl; B – 50 mmol L⁻¹ de SDS) . Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 75 μ m e 50 cm de comprimento efetivo, tensão de 20 kV (modo positivo), Temp. de 20 °C e injeção hidrodinâmica a 0,5 psi por 10 s.

O possível mecanismo de separação da proteína é baseado na formação do complexo proteína-SDS, que envolve interações eletrostáticas, entre a região aniônica do SDS com cadeias laterais catiônicas da proteína, e hidrofóbicas, entre cadeia alquílica do SDS com regiões hidrofóbicas da vizinhança proteica. A formação deste complexo reduz a mobilidade da proteína de forma que a proteína complexada tenha uma velocidade de migração intermediária entre a proteína livre e a micela (JING; KANETA; IMASAKA, 2005; AL-GHOBASHY et al., 2011). Sendo a concentração de SDS um fator importante na formação do complexo proteína-SDS, esta foi avaliada no intervalo de 10 a 50 mmol L⁻¹. Foi observado que o aumento da concentração de SDS ocasionou um aumento no tempo de migração. Isto pode ser explicado pelo fato de os complexos proteína-SDS interagirem com excesso de SDS, que se apresenta na forma de micelas, levando a uma migração mais lenta em comparação aos complexos de proteínas-SDS livres. Entretanto, com a redução da concentração de SDS foram observados picos mais largos, levando a uma redução no número de pratos e na altura dos mesmos. Estes resultados estão de acordo com o que tem sido relatado na literatura (JING;

KANETA; IMASAKA, 2005; AL-GHOBASHY et al., 2011). Assim, a concentração de 50 mmol L⁻¹ de SDS foi escolhida para os ensaios posteriores.

A concentração de tampão tetraborato de sódio foi avaliada no intervalo de 30 a 150 mmol L⁻¹, e foi observado que o aumento gradual na concentração do tampão causou um aumento do tempo de migração (figura 2.5A), que pode ser explicado pelo aumento da viscosidade e redução do potencial zeta e consequente redução do EOF (TAGLIARO et al., 1998; WEINBERGER, 2000). Além disso, foi observada uma redução na eficiência de separação (figura 2.5B). Assim, a concentração de 30 mmol L⁻¹ do tampão tetraborato de sódio foi escolhida para os demais experimentos.

Figura 2.5. Efeito da concentração da solução tampão tetraborato de sódio no tempo de migração (A) e na eficiência (B) da separação do IFN α -2a. Concentração de SDS de 50 mmol L⁻¹, demais condições de análise vide figura 2.4. *** $p < 0,001$ quando comparado ao valor correspondente à concentração de 30 mmol L⁻¹. Análises realizadas em duplicata.

Variações na temperatura do capilar e na tensão aplicada também foram avaliadas. Para a temperatura, um intervalo de 15 a 25 °C foi avaliado e observado que à medida que a temperatura diminuía, houve um aumento no tempo de migração da proteína (Figura 2.6A). Este fato pode ser explicado pela redução na viscosidade da solução tampão, o que facilita a mobilidade das moléculas (WEINBERGER, 2000). No entanto, não se observou diferença estatisticamente significativa em relação à eficiência (Figura 2.6B). Sendo assim, a temperatura de 25 °C foi selecionada para os demais ensaios. A influência da tensão aplicada foi avaliada no intervalo de 20-30 kV e foi observado que o aumento na tensão aplicada provoca uma redução estatisticamente significativa no tempo de migração e um aumento na eficiência. Assim, a tensão de 30 kV foi selecionada.

Figura 2.6. Efeito da temperatura no tempo de migração (A) e na eficiência (B) da separação do IFN α -2a. Solução tampão tetraborato de sódio 30 mmol L⁻¹ com valor de pH de 8,5, com adição de SDS 50 mmol L⁻¹ como eletrólito de corrida. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 75 μ m e 50 cm de comprimento efetivo, tensão de 20 kV (modo positivo) e injeção hidrodinâmica a 0,5 psi por 10 s. * $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente à temperatura de 25 °C. Análises realizadas em duplicata.

A figura 2.7 mostra o eletroferograma após ser realizada a avaliação da influência de diversos parâmetros na análise do IFN α -2a.

Figura 2.7. Eletroferograma obtido após otimização das condições de análise. Condições otimizadas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento efetivo e 75 μ m de diâmetro interno; eletrólito de corrida composto por tampão tetraborato de sódio 30 mmol L⁻¹, solução com valor de pH de 8,5 adicionado de 50 mmol L⁻¹ de SDS; Temp. de 25 °C, tensão 30 kV. Concentração de IFN α -2a: 0,90 MUI mL⁻¹. * picos não identificados.

4.2. Validação do Método

➤ *System Suitability*

O teste de *system suitability* do sistema eletroforético foi realizado antes de se executar a validação. Seis replicatas de injeções de soluções padrão foram feitas e o tempo de migração, fator de cauda, número de pratos e altura dos picos foram determinados. Em todas as análises o número de pratos foi de aproximadamente 12.000, o fator de cauda foi menor do que 2, e CV (%) do tempo de migração e da altura foram menores do que 2,0 % (tabela 2.2).

Tabela 2.2. Resultados do teste *system suitability* para a análise do IFN α -2a

Parâmetro	*Recomendado USP	Dia	Valor Médio ^a	CV (%)
IFN α-2a				
Tempo de Migração	CV (%) ^b < 2	1	7,54	1,66
		2	7,65	0,98
Fator de cauda (FC)	FC < 2	1	0,84	-
		2	0,86	-
Número de Pratos	Valores > 2000	1	11.544	-
		2	10.283	-

* Valores recomendados para HPLC; ^a Valores referentes a análise de seis replicatas; ^b coeficiente de variação

➤ Estabilidade

A Tabela 2.3 mostra os resultados obtidos na avaliação da estabilidade de bancada do IFN α -2a. A estabilidade de bancada da solução aquosa de IFN α -2a foi determinada mantendo a solução à temperatura ambiente (21 ± 2 °C) durante 12 h. Os resultados mostraram que IFN α -2a manteve-se estável durante 12 h.

Tabela 2.3. Estudo de Estabilidade de bancada do IFN α -2a

Analito	Concentração Nominal (MUI mL ⁻¹)	F _{calc}	t - Test (p-valor)
IFN α -2a	0,90 ^a	0,15	0,89
	0,41 ^a	0,05	0,85

^a Análises realizadas em triplicata; Nível de significância $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$, 95% = 0,246; Student t test (α = 0,05).

➤ Seletividade

A seletividade foi avaliada pela análise de amostras do branco, isto é, solução dos excipientes da formulação, amostras dos excipientes fortificado com solução padrão e solução padrão do IFN α -2a. O tempo de retenção do padrão de IFN α -2a foi de 7,5 min. Conforme pode ser observado na figura 2.8 não houve co-migração de picos durante as análises. Sendo assim, o método foi considerado seletivo.

Figura 2.8. (A) Eletroferograma representativo de amostra do branco (placebo sem adição de IFN α -2a). (B) Eletroferograma representativo de amostra do branco fortificado com 0,90 MUI mL⁻¹ de IFN α -2a. (C) Eletroferograma representativo da solução padrão de IFN α -2a na concentração de 0,90 MUI mL⁻¹. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento efetivo e 75 μ m de diâmetro interno; eletrólito de corrida composto por tampão tetraborato de sódio 30 mmol L⁻¹ pH de 8,5 adicionado de 50 mmol L⁻¹ de SDS; Temp. de 25 °C, tensão 30 kV e detecção UV em 200 nm. (1-pico referente ao IFN α -2a. 2 - pico referente ao polissorbato 80. * pico não identificado).

➤ Linearidade

A curva de calibração analítica foi preparada pela plotagem da altura do pico do IFN α -2a no eixo das ordenadas e sua concentração no eixo das abscissas. A altura dos picos e suas respectivas concentrações foram submetidas à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para calcular a equação de calibração e o coeficiente de correlação (r). As curvas de calibração foram lineares no intervalo de concentração de 0,41 a 1,54 MUI mL⁻¹ de IFN α -2a. As equações lineares, coeficientes de correlação e CV (%) são apresentados na tabela 2.4. Todos os valores de r obtidos foram superiores a 0,997, mostrando boa correlação linear entre a altura do pico e as concentrações. A validade estatística dos valores experimentais obtidos para as curvas analíticas foi avaliada pela análise de variância (ANOVA - Lack of fit), cujo resultado é mostrado na tabela 2.4. Os resultados indicam que não houve desvio de linearidade, pois os valores de p foram maiores que 0,05 e F menores que 3,0. A análise de variância apresentados foi realizada pelo programa estatístico Minitab Release versão 14 (State College, Pennsylvania, EUA).

Tabela 2.4. Linearidade^a e limite de quantificação do método

Parâmetros	Dia	IFN α -2a	ANOVA <i>lack of fit</i> ^b / ^b F _{tab}	
			F valor	p valor
Equação Linear	1	$y = 101,08x - 83,968$	1,66	0,22
	2	$y = 69,877x - 70,039$	1,36	0,29
Coeficiente de correlação (r)	1	0,997		
	2	0,997		
Intervalo (MUI mL ⁻¹)	1	0,41 – 1,54		
	2	0,41 – 1,54	CV (%)	ER (%)
LQ (MUI mL ⁻¹)	1	0,41	4,8	- 3,9
	2	0,41	2,6	- 4,6

^a Curva de calibração analítica em triplicata ($n = 3$) para as concentrações de 0,41, 0,58, 0,78, 1,17 e 1,57 MUI mL⁻¹ do IFN α -2a; $y = ax + b$, em que y é a altura do pico do analito, a é o coeficiente angular, b é o coeficiente linear da reta e x é a concentração da solução medida em MUI mL⁻¹. ^b F_{tab} (0,05) = 2,95

➤ LQ

Para o LQ, não são admitidos valores fora da faixa de $\pm 5 \%$ do valor nominal (ANVISA, 2003). Neste trabalho, o LQ foi baseado no menor nível determinável ($0,41 \text{ MUI mL}^{-1}$) com valores de coeficiente de variação de $4,8 \%$ e erro relativo de $3,9 \%$ (tabela 2.4), em acordo com os guias oficiais.

➤ Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas pelo cálculo do CV (%) e o erro relativo (ER, %), respectivamente, para três determinações do IFN α -2a em três níveis de concentração (baixo, médio e alto) e em dois dias diferentes, sob as mesmas condições de análise. A tabela 2.5 mostra os resultados dos ensaios intra-dia e inter-dia. Estes resultados confirmam que a precisão e exatidão do método estão dentro dos limites desejados e recomendados pelos órgãos reguladores, ou seja, para os testes de precisão e exatidão não são admitidos valores fora da faixa de $\pm 15 \%$ do valor nominal (ANVISA, 2003).

Tabela 2.5. Precisão e exatidão do método para análise do IFN α -2a

Parâmetros	IFN α -2a		
Concentração Nominal (MUI mL^{-1})	0,41	0,78	1,54
Intra-dia ($n^a = 3$)			
Concentração analisada (MUI mL^{-1})	0,39	0,80	1,50
Precisão (CV, %) ^b	4,84	3,07	2,89
Exatidão (ER, %) ^c	-3,78	2,57	-2,48
Inter-dia ($n^d = 2$)			
Concentração analisada (MUI mL^{-1})	0,39	0,80	1,49
Precisão (CV, %)	2,61	2,30	4,71
Exatidão (ER, %)	-4,65	3,30	-2,96

^a n = número de determinações; ^b coeficiente de variação; ^c erro relativo; ^d n = número de dias

➤ Robustez

Na determinação da robustez do método, a significância dos efeitos foi avaliada pela análise fatorial plotada no gráfico de Pareto. As respostas obtidas foram processadas pelo *software* estatístico Minitab 14.

A variação da temperatura e tensão aplicadas interferiu de forma significativa no tempo de migração do analito, como mostrado na figura 2.9A. Sendo assim, estes valores devem ser bem controlados durante as análises. Em relação à altura do pico, nenhum parâmetro avaliado interferiu de forma significativa (figura 2.9B).

Figura 2.9. Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis e suas interações na: (A) tempo de migração e (B) altura do pico de IFN α -2a.

4.3. Aplicação do método em Formulação Farmacêutica de IFN α -2a

A aplicabilidade do método proposto foi avaliado pela determinação de IFN α -2a em formulações parenterais disponíveis comercialmente.

Como mencionado no item 1.1, houve a necessidade de realizar uma prévia filtração das amostras devido à quantidade de sal presente na formulação, o qual interfere na análise por CE. Entretanto, nesta filtração podem ocorrer perdas do analito. Assim, para avaliar o processo de filtração, a recuperação do analito foi determinada pela análise da matriz branca (solução contendo os excipientes) enriquecida com padrão de IFN α -2a e realizada a filtração. Os resultados desta análise foram comparados com os resultados da análise da solução do padrão de IFN α -2a e realizado o teste estatístico teste t de *Student* para verificar a significância entre os valores. Pode ser observado, pelos resultados apresentados na tabela 2.6 que o processo de filtração não interferiu na quantificação da proteína.

Tabela 2.6. Avaliação do desempenho do procedimento de filtração

Analito	Concentração Nominal (MUI mL ⁻¹)	Altura – Solução Padrão	Altura – Solução Filtrada	<i>p</i> valor	F _{cal}
IFN α -2a	0,9	4,11 $\pm$ 0,09*	4,13 $\pm$ 0,14*	0,91	2,31

* Média de cinco replicatas $\pm$ media do erro padrão. Não pareado *t test* – nível de significância de $P < 0,05$.
Nível de significância de $F_{cal} < F_{tab, 95\%} = 6,39$

Um eletroferograma típico resultante da análise da formulação de IFN α -2a é mostrado na figura 2.10.

Figura 2.10. Eletroferograma referente à análise do IFN α -2a na formulação farmacêutica. Condições eletroforéticas: *vide* figura 2.7. (1- pico referente ao IFN α -2a. 2 - pico referente ao polissorbato 80. * pico não identificado).

Em relação à quantificação do IFN α -2a nas formulações, os resultados obtidos apresentaram bons valores para recuperação (aproximadamente 103,1 %), baixo erro relativo (aproximadamente 2,8 %) e boa precisão (CV de aproximadamente 3,4 %) (tabela 2.7).

Tabela 2.7. Determinação do IFN α -2a em formulação farmacêutica em dois dias consecutivos

Dia	IFN α-2a (3 MUI /0,5 mL)^a			IFN α-2a (9 MUI /0,5 mL)^a		
	% Encontrada^b	CV (%)	ER (%)	% Encontrada^b	CV (%)	ER (%)
1	103,8	4,9	3,8	102,3	2,4	2,3
2	101,4	3,9	1,4	103,8	3,2	3,8

^a Especificações de fabricante; ^b Média da análise de cinco replicatas

5. COMENTÁRIOS FINAIS

A técnica de eletroforese capilar foi utilizada para o desenvolvimento e validação de um método para análise do IFN α -2a, com tempo de análise de 16 minutos e número de pratos superior a 11.000. A análise do IFN α -2a, pela técnica de eletromigração em capilar, já havia sido realizada por Na et al. (2004; 2008), em que o autores empregaram a eletroforese capilar em gel. Entretanto, este método descrito na literatura não foi validado. Portanto, o método descrito aqui é a primeira contribuição de um método totalmente validado empregando a eletroforese capilar em solução livre para análise do IFN α -2a.

Após sua validação, o método foi aplicado para a análise de formulações farmacêuticas comerciais, podendo ser utilizado na indústria farmacêutica, sendo uma alternativa valiosa para as análises que empregam HPLC e contribuindo para melhorar o controle de qualidade, de forma a garantir uma maior segurança e eficácia do produto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5°. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 590 ISBN 85-352-1533-6.

AL-GHOBASHY, M. A. et al. CZE with On-line Micellar Sample Stacking for Determination of Protein Concentration of Biopharmaceuticals. **Chromatographia**, v. 73, n. 11-12, p. 1145-1153, Jun 2011. ISSN 0009-5893. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290731700014 >.

ALTRIA, K. D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications**. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc., 1996. 349.

BACCARANI, M. et al. Interferon-alfa for chronic myeloid leukemia. **Seminars in Hematology**, v. 40, n. 1, p. 22-33, Jan 2003. ISSN 0037-1963. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180760000004 >.

BARONE, A. A. et al. Are Anti-Interferon Antibodies the Cause of Failure in Chronic HCV Hepatitis Treatment? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 8, 2004.

BETHESDA, M. D. **AHFS Drug Information: Eletronic version**. USA: American Society of Health-System Pharmacists 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Genéricos-Legislação-Resolução-RE. no. 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&mode=PRINT_VERSION. Acesso em 1 de novembro de 2011.

CHAVES, A. R. et al. Biocompatible in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection for determination of interferon alpha in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 21, p. 3376-3381, May 2011. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290883000035 >.

CORRADINI, D. Buffer additives other than the surfactant sodium dodecyl sulfate for protein separations by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 699, n. 1-2, p. 221-256, Oct 1997. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997YD84400014 >.

CRAIG, S. J. et al. The effect of operating parameters on the analysis of a human alpha-interferon by capillary zone electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 18, n. 18-19, p. 3629-3641, 1995. ISSN 0148-3919. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995TJ40000007 >.

DA SILVA, L. M. et al. Validation of an RP-LC Method for the Determination of Interferon-2a in Pharmaceutical Formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32, n. 3, p. 370-382, 2009. ISSN 1082-6076. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262296300003 >.

DAVIS, G. L.; KRAWCZYNSKI, K.; SZABO, G. Hepatitis C virus infection - Pathobiology and implications for new therapeutic options. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 4, p. 857-875, Apr 2007. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245131900001 >.

DE BRUIJNE, J. et al. New developments in the antiviral treatment of hepatitis C. **Vox Sanguinis**, v. 97, n. 1, p. 1-12, 2009. ISSN 0042-9007. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000266845200001 >.

DOLNIK, V. Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007. **Electrophoresis**, v. 29, n. 1, p. 143-156, Jan 2008. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000252826500013 >.

DONGES, R. et al. Separation of antithrombin III variants by micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 924, n. 1-2, p. 307-313, Jul 2001. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000170359200030 >.

GENNARO, L. A.; SALAS-SOLANO, O.; MA, S. Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a characterization tool for therapeutic proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 355, n. 2, p. 249-258, Aug 2006. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239638300011 >.

GUZMAN, N. A. et al. Assessment of capillary electrophoresis in pharmaceutical applications - analysis and quantification of a recombinant cytokine in an injectable dosage form. **Journal of Chromatography**, v. 559, n. 1-2, p. 307-315, Oct 1991. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991GP17100027 >.

_____. Effect of buffer constituents on the determination of therapeutic proteins by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 608, n. 1-2, p. 197-204, Sep 1992. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992JN98000026 >.

HUANG, Y. S. et al. Preparation and characterization of a potent, long-lasting recombinant human serum albumin-interferon-alpha 2b fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 2, p. 301-308, Sep 2007. ISSN 0939-6411. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249509800001 >.

JING, P.; KANETA, T.; IMASAKA, T. On-line concentration of a protein using denaturation by sodium dodecyl sulfate. **Analytical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 37-42, Jan 2005. ISSN 0910-6340. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226362300008 >.

JUSTA, S. et al. Cellular Immune Response and Cytokine Profile Among Hepatitis C Positive Living Donor Renal Transplant Recipients. **Transplantation**, v. 90, n. 6, p. 654-660, Sep 2010. ISSN 0041-1337. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281910500009 >.

KLAUS, W. et al. The three-dimensional high resolution structure of human interferon alpha-2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. **Journal of Molecular Biology**, v. 274, n. 4, p. 661-675, Dec 1997. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000071252400019 >.

LACHER, N. A. et al. Development, validation, and implementation of capillary gel electrophoresis as a replacement for SDS-PAGE for purity analysis of IgG2 mAbs. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 2, p. 218-227, Feb 2010. ISSN 1615-9306. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274578000012 >.

LAUER, H. H.; MCMANIGILL, D. Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused-silica tubing. **Analytical Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 166-170, Jan 1986. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986AWT6800046 >.

LI, S. F. Y. **Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1992. 582.

NA, D. H. et al. Sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of polyethylene glycolylated interferon alpha. **Electrophoresis**, vol. 25, n. 3, p. 476-479, Feb 2004. DOI 10.1002/elps.200305684.

NA, D. H. et al. Capillary electrophoretic separation of high-molecular-weight poly(ethylene glycol)-modified proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 373, n. 2, p. 207-212, Feb 2008. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000252514100004 >.

OLIVA, A.; FARINA, J. B.; LLABRES, M. New trends in analysis of biopharmaceutical products. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 4, p. 230-248, Nov 2007. ISSN 1573-4129. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250645700002 >.

PHILLIPS, T. M.; DICKENS, B. F. Analysis of recombinant cytokines in human body fluids by immunoaffinity capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, n. 16-17, p. 2991-2996, Nov 1998. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000077570900031 >.

PLATANIAS, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 5, p. 375-386, May 2005. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228833700012 >.

RACAITYTE, K.; KIESSIG, S.; KALMAN, F. Application of capillary zone electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography in the biopharmaceutical industry for the quantitative analysis of the monosaccharides released from a highly glycosylated therapeutic protein. **Journal of Chromatography A**, v. 1079, n. 1-2, p. 354-365, Jun 2005. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230228200040 >.

REIMER, T.; SCHWEIZER, M.; JUNGI, T. W. Type I IFN induction in response to *Listeria monocytogenes* in human macrophages: Evidence for a differential activation of IFN regulatory factor 3 (IRF3). **Journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1166-1177, Jul 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247752100055 >.

SANTANA, H. et al. Molecular characterization of recombinant human interferon alpha-2b produced in Cuba. **Biotecnologia Aplicada**, v. 16, p. 6, 1999.

SEEDS, R. E.; GORDON, S.; MILLER, J. L. Characterisation of myeloid receptor expression and interferon alpha/beta production in murine plasmacytoid dendritic cells by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 350, n. 1-2, p. 106-117, Oct 2009. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000271761100013 >.

STAUB, A. et al. Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 810-822, Jun 2011. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290357600016 >.

STUBGEN, J. P. Interferon alpha and neuromuscular disorders. **Journal of Neuroimmunology**, v. 207, n. 1-2, p. 3-17, Feb 2009. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264510400002 >.

TAGLIARO, F. et al. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 92, n. 2-3, p. 75-88, Apr 1998. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000073626800002 >.

TANAKA, Y.; TERABE, S. Recent advances in enantiomer separations by affinity capillary electrophoresis using proteins and peptides. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 48, n. 2, p. 103-116, Apr 2001. ISSN 0165-022X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168918700003 >.

TAVARES, M. F. M. Separation mechanisms in capillary electrophoresis. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, Sep-Oct 1997. ISSN 0100-4042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XX09800009 >.

THITINAN, S.; McCONVILLE, J. T. Interferon alpha delivery systems for the treatment of hepatitis C. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 369, n. 1-2, p. 121-135, Mar 2009. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264593900019 >.

VESPALEC, R.; BOCEK, P. Chiral separations in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 20, n. 13, p. 2579-2591, Sep 1999. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000085044100002 >.

WATZIG, H.; DEGENHARDT, M.; KUNKEL, A. Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications. **Electrophoresis**, v. 19, n. 16-17, p. 2695-2752, Nov 1998. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000077570900002 >.

WEINBERGER, R. Capillary Zone Electrophoresis Basic Concepts. In: WEINBERGER, R. (Ed.). **Practical Capillary Electrophoresis**. Second. USA: Academic Press, 2000. cap. 2, p.25-72. ISBN 978-0127423562.

***CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO,
VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO
PARA ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA
ISRADIPINA POR ELETROFORESE
CAPILAR***

---

1. INTRODUÇÃO

Isradipina (IRD) é um potente bloqueador dos canais de cálcio, da classe das dihidropiridinas (DHPs), utilizada para o tratamento de hipertensão e angina pectoris (WALTON; SYMES, 1993; DOAT et al., 1996). Os bloqueadores dos canais de cálcio inibem o influxo de íons cálcio através de canais de cálcio controlados por tensão localizados na membrana celular (HOF et al., 1986). A IRD, como outras dihidropiridinas, é metabolizada pelo citocromo P450, especificamente CYP3A4, resultando na formação de vários metabólitos (CHRISTENSEN et al., 2000).

Devido à presença de um grupo éster assimétrico, a IRD tem um átomo de carbono quiral na posição 4 do anel piridínico (figura 3.1). É comercialmente disponível como uma mistura racêmica de (+)-(S)- e (-)-(R)-IRD. Hof et al. (1986), mostraram uma grande diferença nos efeitos farmacológicos dos enantiômeros, em que (+)-(S)-IRD apresentou inibição da despolarização induzida por contração da aorta de coelho (*in vitro*) 160 vezes maior do (-)-(R)-IRD, e esta diferença mostrou ser de 30 e 300 vezes maior, com relação ao fluxo sanguíneo coronariano subendocárdico e redução da pressão arterial, respectivamente, em estudos *in vivo*.

Figura 3.1. Estrutura química (A) IRD e (B) impureza D. *Centro quiral.

A IRD, como as demais DHPs, apresenta uma propriedade indesejável do ponto de vista farmacêutico, a sua sensibilidade fotoquímica, em que modificações moleculares podem ocorrer de forma a gerar uma diminuição de seu efeito terapêutico e o aparecimento de alguns efeitos tóxicos após a administração (BARANDA et al., 2006; AL AZZAM et al., 2011). O principal metabólito da IRD, a impureza D, é formada por desidrogenação do anel piridínico, resultando na perda do seu centro quiral (figura 3.1) (BIDOUIL; DUBOIS; HANOCQ, 1997; BARTLETT et al., 1998).

Métodos que indicam a estabilidade dos fármacos são estabelecidos para fornecer evidência sobre a qualidade deste quando expostos às condições ambientais externas, como pH, temperatura, meios oxidativos e à luz. As investigações sobre a estabilidade de fármacos estão ganhando maior relevância na indústria farmacêutica como um fator importante para se determinar tanto a eficácia quanto a toxicidade, uma vez que as alterações na estrutura podem induzir alterações nas suas propriedades farmacológicas com a falta de efeito terapêutico. Sendo ainda importante para adequar as condições de armazenamento, períodos de re-testes e estabelecer a vida de prateleira destes (BARANDA et al., 2006; AL AZZAM et al., 2011).

Uma vez que os efeitos farmacológicos dos enantiômeros da IRD podem ser diferentes (CARDENAS et al., 1988; HANDROCK et al., 1999), há uma necessidade do desenvolvimento de métodos enantiosseletivos. Diversos métodos, utilizando a cromatografia quiral, tem sido apresentados para a análise enantiosseletiva da IRD. Estes métodos empregaram a α 1-glicoproteína ácida como fase estacionária (BARBATO et al., 2000; BOATTO et al., 2003), e derivados de polissacarídeos (OKAMOTO et al., 1990; RASK; ANGELO; CHRISTENSEN, 1998). Além disso, um método empregando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foi relatado para a determinação de produtos de degradação da IRD (BARTLETT et al., 1998).

Os métodos enantiosseletivos por cromatografia requerem colunas quirais de alto valor, ou grandes quantidades de seletor quiral adicionado à fase móvel, quando opta-se pelo método indireto (AL AZZAM et al., 2010). Assim, a eletroforese capilar tem sido utilizada como uma técnica alternativa à cromatografia para análise de compostos quirais. Christians e Holzgrabe (2000) realizaram a separação enantiomérica de 29 DHPs, sendo elas ácidas, neutras e básicas, por CE, empregando CDs neutras e carregadas negativamente. A SBE- β -CD promoveu a separação de linha de base das DHPs neutras estudadas, no modo de polaridade reversa. Porém, neste estudo os autores não realizaram a separação enantiomérica da IRD. Gilar, Uhrova e Tesarova (1996) utilizaram diferentes CDs na enantioseparação de diversas dihidropiridinas. Entretanto não conseguiram realizar a enantioseparação da IRD. Desta forma, até o presente momento, não foi descrito na literatura um método quiral por CE para determinação dos enantiômeros da IRD. Com base nesse contexto, a técnica de CE foi utilizada no desenvolvimento de um método de análise enantiosseletivo para a análise da IRD.

2. OBJETIVOS

Os objetivos desta etapa foram:

- otimizar as condições para análise enantiosseletiva da IRD por CE;
- validar as condições otimizadas de análise;
- aplicar o método desenvolvido e validado em formulação farmacêutica e em estudo de estabilidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes e Soluções

A solução estoque do padrão de IRD (British Pharmacopoeia, Stanmore, Reino Unido), com pureza declarada de 99,8 %, foi preparada em metanol na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (de cada enantiômero). As soluções de trabalho de IRD utilizadas durante a etapa de validação do método foram preparadas, diariamente, por diluição da solução estoque, em metanol, nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada enantiômero do fármaco. As soluções de trabalho foram estocadas em tubos de vidro âmbar sob refrigeração a $4 \pm 1^\circ\text{C}$. A formulação farmacêutica contendo IRD (cápsulas contendo quantidade declarada de 5 mg do racemato) foi adquirida do comércio local.

Todas as soluções foram filtradas em dispositivos filtrantes confeccionados em poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) de $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade (Millipore, Massachusetts, EUA) antes do uso e a água utilizada no preparo dos eletrólitos de corrida e na lavagem do capilar foi obtida do sistema de purificação Direct Q3 (Millipore, Massachusetts, EUA). Os solventes utilizados foram metanol e acetonitrila (J.T. Baker, New Jersey, EUA). Os componentes empregados no preparo das soluções tampão foram pesados em balança analítica modelo CP224S (Sartorius, New York, EUA). Para degaseificação das soluções foi utilizado um aparelho de ultra-som modelo Q3350 (Quimis, São Paulo, Brasil). O ajuste do pH das soluções foi realizado pela adição de solução de HCl (1 mol L^{-1}) ou de NaOH (1 mol L^{-1}), conforme a necessidade.

3.2. Equipamento e condicionamento do capilar

As análises eletroforéticas da IRD foram realizadas em um sistema de CE (Agilent Technologies, Waldbrook, Alemanha), composto por um analisador modelo G1600A e um detector por absorção no UV-VIS com arranjo de diodos, operando em 239 nm. As injeções foram realizadas por um amostrador automático. O equipamento foi controlado pelo *software* Chemstation® 3D-CE, versão B.04.01, o qual também foi usado na aquisição e tratamento dos dados.

O capilar de sílica fundida, revestido externamente por uma camada de poliimida, foi adquirido em rolos de 25 m (Microsolv, New Jersey, EUA). Para as análises foi utilizado um

capilar de 50 μm de diâmetro interno, preparado no laboratório com aproximadamente 58,5 cm de comprimento total e 50 cm de comprimento efetivo. A janela óptica de detecção ($\approx 0,5$ cm de comprimento) foi construída pela remoção do revestimento de poliimida a 8,5 cm de uma das extremidades do capilar, através da aplicação de calor. A poliimida queimada foi removida com o auxílio de um algodão embebido em acetona (Mallinckrodt, Kentucky, EUA).

Antes do primeiro uso, os capilares novos foram condicionados por lavagem com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ durante 30 min e água ultrapura durante 30 min. No início de cada dia, o capilar era condicionado com uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹ durante 10 min, seguido de uma etapa de lavagem com água ultrapura por 10 min e uma terceira etapa com o eletrólito de corrida durante os mesmos 10 min. Entre as análises o capilar era condicionado por 2 min com NaOH 0,1 mol L⁻¹, 2 min com água ultrapura e 3 min com o eletrólito de corrida. Ao final das análises, o capilar era lavado com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 15 min, seguido por uma etapa de lavagem com água ultrapura por 15 min. Durante o armazenamento, as extremidades do capilar permaneceram imersas em água ultrapura.

3.3. Otimização das condições analíticas

Durante os experimentos para o desenvolvimento e a otimização do método foram utilizadas soluções de IRD na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mistura racêmica).

➤ Eletrólito de Corrida

O efeito do tipo do eletrólito na separação enantiomérica da IRD foi avaliado pela realização da separação eletroforética utilizando tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 7,0 e tampão borato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 9,3. Para realizar estes testes foi utilizado tensão de (+) 20 kV, a uma temperatura de 25 °C e 2 % SBE- β -CD, como seletor quiral.

➤ Seletor quiral

Diferentes seletos quirais, incluindo formas nativas e derivadas neutras e carregadas negativamente de CD, foram avaliados no modo de polaridade normal para selecionar o

seletor quiral mais adequado para a separação enantiosseletiva da IRD e de seu metabólito impureza D, com resolução e tempo de análise adequados. As CDs avaliadas foram:

- β -CD – (Fluka, Buch, Suíça);
- HP- β -CD – (Aldrich Chemical, Wisconsin, EUA);
- SBE- β -CD – (CyDex; Advasep® 4, Kansas, EUA);
- CM- β -CD – (Fluka, Buch, Suíça);
- S- β -CD – (Fluka, Buch, Suíça).

As CDs testadas foram avaliadas na porcentagem de 1 % m/v, com exceção da β -CD e da SBE- β -CD, que foram avaliadas na porcentagem de 2 % m/v. Para realizar estes testes foi utilizado tensão de (+) 20 kV, temperatura de 25 °C e tampão borato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 9,3, como eletrólito de corrida.

➤ Concentração do Eletrólito de Corrida

O efeito da concentração do eletrólito, constituído por tampão borato de sódio, na separação enantiomérica da IRD, foi avaliado nas concentrações de 15, 25, 50, 75 e 100 mmol L⁻¹, mantendo-se o pH em 9,3. As concentrações do tampão foram preparadas pela mistura de quantidades apropriadas de tetraborato de sódio decaidratado e o pH ajustado com ácido clorídrico (0,5 mol L⁻¹), com adição de 2 % SBE- β -CD como selector quiral.

➤ Porcentagem de CD

O efeito da porcentagem de CD foi avaliada para otimizar a resolução (R_s) e o tempo de migração. As porcentagens de SBE- β -CD avaliadas foram: 1, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 % (m/v).

➤ Avaliação da Temperatura e da Tensão

A fim de determinar a temperatura ótima para a resolução de IRD enantiômeros, corridas eletroforéticas em diferentes temperaturas (15, 20, 25 e 30 °C) foram realizadas e a separação dos enantiômeros examinada.

O efeito da tensão sobre o tempo de migração e a resolução dos enantiômeros da IRD também foi avaliada nos valores de 15, 20, 25 e 30 kV. O tempo de migração e a resolução dos enantiômeros foram calculados e a tensão ótima para a análise foi determinada.

3.4. Ordem de Migração

De acordo com Barbato et al. (2000), (S)-IRD é dextrógira e (R)-IRD é levógira. A ordem de migração foi estabelecida pela análise dos enantiômeros da IRD de acordo com o trabalho descrito por Rask, Angelo e Christensen (1998). Sendo assim, 25 μL de solução padrão (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura racêmica) preparada em metanol, foi analisada em uma coluna Chiralcel OJ (250 x 4,6 mm, partícula de 5 μm , Daicel Chemical Industries, Tóquio, Japão) usando como fase móvel uma mistura de hexano:isopropanol (90,5:9,5, v/v) na vazão de 1 mL min^{-1} . Os dois picos correspondentes a (+)-(S)-IRD e (-)-(R)-IRD foram coletados no final do detector, o solvente foi evaporado e os resíduos foram analisados nas condições descritas no presente trabalho e a ordem de migração estabelecida.

3.5. Validação do Método

Para a análise dos enantiômeros da IRD, os métodos foram validados empregando-se soluções padrão. O teste de estabilidade de solução-padrão e teste de *system suitability* foi realizado antes de iniciar a validação. Os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez, seguindo as diretrizes da Resolução 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), da farmacopéia Norte Americana - United States Pharmacopeia (USP - 2009) e do ICH (1996).

➤ Estabilidade no auto-injetor e *system suitability*

Para realizar o teste de estabilidade da amostra, uma solução padrão de racemato da IRD de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (em triplicata) foi armazenado em frascos âmbar a temperatura ambiente (dentro do auto-injetor) e analisados em intervalos de 1, 2, 3, 4, 6 e 8 h. As respostas da análise destas soluções foram comparadas a uma solução-padrão recentemente preparada.

O teste de *system suitability* foi realizado para avaliar se a resolução e a reprodutibilidade do sistema de análise são adequados ao fim proposto, usando oito replicatas das soluções-padrão contendo 200 µg mL⁻¹ de IRD.

➤ Seletividade

Conforme preconizado pelos órgãos regulamentadores, a seletividade do método pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) fortificadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes da formulação e amostras não fortificadas, demonstrando que o resultado do teste não é afetado por tais materiais (ANVISA, 2003). Diante da indisponibilidade de se obter impurezas e/ou padrão do produto de degradação, o estudo de estabilidade realizado neste trabalho foi empregado para demonstrar a seletividade do método.

➤ Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da construção do gráfico de calibração com cinco níveis de concentração dos enantiômeros da IRD abrangendo a faixa de 25 a 150 µg mL⁻¹. Triplicatas das soluções-padrão foram feitas e a área do pico dos eletroferogramas foi plotada contra a concentração dos enantiômeros da IRD. Os dados foram então submetidos à análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados para o cálculo da curva analítica e do coeficiente de correlação (r).

➤ LD e LQ

O LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada. O LQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão. Valores de LD e LQ foram calculados diretamente usando os parâmetros da curva analítica, utilizando as seguintes equações:

$$LD = \frac{\sigma}{s} \times 3 \quad (3.1)$$

$$LQ = \frac{\sigma}{s} \times 10 \quad (3.2)$$

em que σ é o desvio padrão do coeficiente linear de no mínimo 3 curvas de calibração e s é a média do coeficiente angular de 3 curvas de calibração, conforme definido pelo (ICH - 1996).

➤ Precisão e Exatidão

A repetibilidade do método foi avaliada por estudos de precisão intra e inter-dias. A precisão intra-dia foi determinada pela análise das amostras em três diferentes concentrações de enantiômeros da IRD (50, 100 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. A precisão inter-dia foi avaliada pela análise da IRD, em dois dias diferentes, nas concentrações citadas acima. A exatidão intra e inter-dias foi avaliada nas mesmas condições e concentrações descritas para a precisão.

Conforme preconizado, para os testes de precisão e exatidão não são admitidos valores fora da faixa de $\pm 15 \%$ (quinze por cento) do valor nominal (ANVISA, 2003).

➤ Robustez

A robustez, ou seja, a medida da capacidade do método permanecer inalterado por pequenas mudanças deliberadas nas condições eletroforéticas foi estudada para soluções padrão de IRD, analisando-as em condições ligeiramente alteradas a partir do método definido. O teste de robustez foi avaliado usando um delineamento fatorial em dois níveis: alto e baixo, 2^{4-1} (oito experimentos), realizado pela seleção de quatro fatores: concentração do tampão borato de sódio, pH, concentração SBE- β -CD e temperatura de capilar. Os fatores e seus níveis avaliados neste estudo são apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Variáveis selecionadas como fatores e valores escolhidos como níveis para avaliação da robustez do método

Fatores	Valor ótimo	Nível Baixo	Nível Alto
pH da solução Tampão	9,3	9,1	9,5
Concentração do Tampão (mmol L^{-1})	15,0	13,0	17,0
Porcentagem de SBE- β -CD ($\%, m/v$)	2,5	2,3	2,7
Temperatura do Capilar ($^{\circ}\text{C}$)	25,0	23,0	27,0

As respostas obtidas, tempo de migração, resolução e área, foram processadas pelo software Minitab estatística 14 (State College, Pennsylvania, EUA) para avaliar a significância dos efeitos.

3.6. Aplicações do Método

3.6.1. Estudo de Estabilidade – Teste de Estresse

Estudos de estabilidade foram realizados de modo a fornecer indicação da estabilidade da IRD e seletividade do método proposto. Estes estudos foram realizados seguindo o modelo proposto por Fakhari et al. (2008). Degradação forçada em condições de estresse como hidrólise ácida, básica e oxidação e também exposição à luz foi realizada para avaliar a capacidade do método proposto para separar os enantiômeros da IRD de seus produtos de degradação:

➤ Hidrólise ácida e alcalina

Para os estudos de hidrólise ácida ou básica, houve a necessidade de uma prévia solubilização do padrão da IRD em metanol devido à presença de precipitado quando o fármaco é dissolvido diretamente em solução ácida ou básica. As soluções empregadas para hidrólise ácida e básica foram 0,08 mol L⁻¹ de HCl e 0,08 mol L⁻¹ de NaOH, respectivamente. Estas soluções foram adicionadas à solução metanólica de IRD obtendo-se, ao final, uma mistura de solução ácida ou básica:metanol (80:20, v/v) na concentração de 800 µg mL⁻¹ de IRD (mistura racêmica). Estas soluções foram armazenadas ao abrigo da luz e mantidas à temperatura ambiente durante o tempo de exposição aos meios.

Para este estudo, os tempos de exposição aos respectivos meios (ácido ou básico) foram 0, 15, 30, 60, 240 e 1440 min. Ao final destes tempos as amostras foram diluídas em uma solução de água:metanol (80:20, v/v), a fim de obter uma solução na concentração de 200 µg mL⁻¹ do racemato.

➤ Oxidação

De forma semelhante ao estudo em meio ácido ou básico, a IRD foi solubilizada inicialmente em metanol. Após o preparo desta solução foi adicionado peróxido de hidrogênio 1,5 %, obtendo-se assim, uma solução de peróxido de hidrogênio-metanol (80:20, v/v) na concentração de 800 µg mL⁻¹. Para este estudo os tempos de exposição da IRD na solução de peróxido foram 0, 15, 30, 60, 240 e 1440 min. Ao final destes tempos as amostras foram

diluídas em uma solução de água-metanol (80:20, v/v), a fim de obter uma solução na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ do racemato.

➤ Fotoestabilidade

O estudo de fotoestabilidade foi realizado pela exposição à luz ultra-violeta em 254 nm, em lâmpada de mercúrio Hg de baixa pressão (DESAGA, Heidelberg, Alemanha) instalado em um gabinete de cromatografia em camada delgada. A solução para uso no estudo de fotodegradação ($800 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada em metanol e exposta à luz, sendo os tempos de exposição de 0, 24, 48, 72 e 96 h, a uma distância de 10 cm entre a fonte emissora e a solução de amostra. Antes da análise eletroforética, concentrações finais de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ da IRD foram preparadas por diluição em uma mistura de água-metanol (80:20, v/v), e, em seguida, as soluções foram analisados conforme já descrito.

3.6.2. Análise de Formulação Farmacêutica

Cápsulas do fármaco, com teor declarado de 5 mg da mistura racêmica de IRD foram analisadas. Dez cápsulas foram exatamente pesadas e seus conteúdos foram cuidadosamente misturados e pulverizados com auxílio de gral e pistilo, de modo a se obter um pó fino. Uma quantidade equivalente a 10 mg da mistura racêmica de IRD foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL e aproximadamente 6 mL de acetonitrila foram adicionados. A mistura foi então mantida em banho ultrassônico durante 10 min e, em seguida aferido o volume. Após isto, esta solução foi centrifugada a 1.800 g durante 15 min, a 4 °C e uma alíquota de 2 ml do sobrenadante foi então transferida para outro balão volumétrico de 10 mL, e o volume completado com metanol. Ao final deste processo uma solução de concentração nominal de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura racêmica foi analisada. Esta análise foi realizada em dois lotes diferentes em dois dias consecutivos e em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem da quantidade declarada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização do Método

A separação enantiomérica da IRD e a separação de seu metabólito foi otimizada pela avaliação de diversos parâmetros, incluindo o eletrólito de corrida (tipo, concentração e pH), seletor quiral (tipo e concentração), tensão aplicada e temperatura do capilar.

Como a IRD é uma DHP neutra (BOATTO et al., 2003), os experimentos iniciais foram feitos com eletrólitos de corrida constituídos por tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 7,0 e borato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 9,3. Quando solução tampão fosfato de sódio foi empregada, nenhum pico foi observado antes de 20 min, enquanto que em solução tampão borato de sódio houve a migração da IRD. Assim, a solução tampão borato de sódio foi selecionada para a os demais experimentos.

A seleção da CD adequada para a separação quiral foi feita inicialmente considerando a forma e o tamanho do analito e da CD. Inicialmente foram avaliadas a β -CD nativa e a HP- β -CD. Entretanto, com estas CDs não foi possível obter a enantioseparação da IRD (figura 3.2A). Isto ocorre em virtude das CDs neutras não apresentarem carga em nenhum valor de pH (BLANCO; VALVERDE, 2003) e, nessas condições, estas são movidos apenas pelo EOF, assim como fármacos de caráter neutro. Empregando a S- β -CD, nenhuma separação foi observada, como mostrado na figura 3.2B, possivelmente devido ao impedimento da interação hidrofóbica entre o analito e a cavidade da CD, provocado pelo grupo sulfato ligado à CD (GILAR; UHROVA; TESAROVA, 1996; CHRISTIANS; HOLZGRABE, 2000). Utilizando a CM- β -CD, uma CD carregada negativamente, foi observada uma discreta separação dos enantiômeros da IRD (figura 3.2C) e utilizando a SBE- β -CD, uma CD de caráter aniônico, foi possível obter uma resolução entre os enantiômeros da IRD (figura 3.2D). Assim, a SBE- β -CD foi selecionada para estudos posteriores.

Figura 3.2. Influência de diferentes CD na resolução dos enantiômeros da IRD. A) HP- β -CD (1,0 %, m/v); B) S- β -CD (1,0 %, m/v); C) CM- β -CD (1,0 %, m/v) e D) SBE- β -CD (2,0 %, m/v). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com 50 μ m de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, tampão borato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 9,3, tensão de 20 kV e Temp. de 25 °C. A concentração de cada enantiômero da IRD na amostra analisada foi 100 μ g mL⁻¹.

A concentração do eletrólito de corrida é outro parâmetro importante a ser controlado com a finalidade de melhorar a seletividade da separação. Experimentos usando diferentes concentrações de tampão borato de sódio (15 - 100 mmol L⁻¹) foram realizados com a finalidade de alcançar a máxima eficiência, menor tempo de migração e a melhor resolução entre os enantiômeros da IRD e a impureza D.

A concentração do eletrólito de corrida influencia o EOF e por consequência o tempo de migração do analito. Conforme apresentado na figura 3.3A, a enantioseparação foi alcançada para todas as concentrações avaliadas, porém um aumento no tempo de migração foi observado com o aumento da concentração do eletrólito (figuras 3.3B). Este fato pode ser explicado pelo aumento na viscosidade do meio e pelo aumento da força iônica, o que acarreta a diminuição do potencial zeta e consequentemente leva a uma redução no EOF (TAGLIARO; TURRINA; SMITH, 1996; TAGLIARO et al., 1998; WEINBERGER, 2000). Com base nestes resultados a solução tampão borato de sódio 15 mmol L⁻¹ foi escolhida para as demais análises, por manter o compromisso entre a resolução e o tempo de análise.

Figura 3.3. Efeito da concentração da solução tampão borato de sódio na resolução (A) e no tempo de migração (B) dos enantiômeros da IRD. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com 50 μm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, tampão borato de sódio pH 9,3, SBE- β -CD (2,0 %, m/v), tensão de 20 kV e Temp. de 25 °C. A concentração de cada enantiômero da IRD na amostra analisada foi 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A porcentagem da CD tem influência significativa na resolução quiral, a qual pode ser aumentada pelo aumento da porcentagem de CD até um valor máximo (que depende da constante de associação entre os analitos e o seletor quiral) (FANALI; ATURKI; DESIDERIO, 1998; RIZZI, 2001). O efeito das diferentes porcentagens de SBE- β -CD (1 - 3 %, m/v) sobre o tempo de migração e a resolução foi investigado.

A separação quiral foi alcançada para todas as porcentagens testadas. Entretanto, o aumento da porcentagem de SBE- β -CD proporcionou uma maior resolução e tempos de migração mais longos (figuras 3.4A e B). Este fato é provavelmente devido à complexação favorável com o seletor quiral sob as condições de análise. Mediante os dados apresentados e a melhor resolução e tempo de análise, a porcentagem de 2,5 % de SBE- β -CD foi escolhida para análises posteriores.

Figura 3.4. Efeito da porcentagem de SBE-β-CD na resolução (A) e no tempo de migração (B) dos enantiômeros da IRD. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com 50 μm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, tampão borato de sódio 15 mmol L⁻¹, pH 9,3, tensão de 20 kV e Temp. de 25 °C. A concentração de cada enantiômero da IRD na amostra analisada foi 100 μg mL⁻¹.

Após a escolha do seletor quirál e do eletrólito, a influência da temperatura do capilar foi avaliada. O aumento da temperatura de 15 para 30 °C afetou a resolução negativamente (figuras 3.5A). Este efeito pode ser atribuído à temperatura influenciar vários parâmetros, tais como, a mobilidade de analitos, a cinética e a termodinâmica do complexo de inclusão formado entre o analito e a CD (FANALI, 1997, 2000). O aumento da temperatura provoca uma diminuição da constante de associação de complexo analito-CD (FANALI, 1997), por um aumento da energia de rotação e/ou vibração, diminuindo a fixação dos enantiômeros no interior ou na parte superior da CD e, assim, diminui a enantiosseletividade (HEUERMANN; BLASCHKE, 1993; LINDNER; BOHS; SEIDEL, 1995).

Figura 3.5. Efeito da temperatura na resolução (A) e no tempo de migração (B) dos enantiômeros da IRD. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com 50 μm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, tampão borato de sódio 15 mmol L^{-1} , pH 9,3, tensão de 20 kV, porcentagem de SBE- β -CD de 2,5 %. A concentração de cada enantiômero da IRD na amostra analisada foi 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Diferentemente da resolução, o aumento da temperatura de 15 para 30 °C afetou de modo positivo o tempo de migração (figuras 3.5 B). Com o aumento da temperatura, o tempo de migração diminuiu devido à redução da viscosidade do eletrólito de corrida (WEINBERGER, 2000). Assim, para manter o compromisso entre a resolução e o tempo de migração, a temperatura de 25 °C foi selecionada para as análises posteriores.

A influência da tensão aplicada foi avaliada em diferentes níveis: 15, 20, 25 e 30 kV. A velocidade eletroforética está relacionada com a mobilidade dos íons na solução e com a tensão aplicada (ALTRIA, 1996; TAGLIARO; TURRINA; SMITH, 1996; WEINBERGER, 2000). Desse modo, um aumento da tensão aplicada no capilar leva a uma redução nos tempos de migração e na resolução dos compostos.

Uma boa resolução, picos mais simétricos e razoáveis tempos de migração foram encontrados quando uma tensão de 30 kV foi utilizada (figuras 3.6 A e B).

Figura 3.6. Efeito da tensão na resolução (A) e no tempo de migração (B) dos enantiômeros da IRD. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com 50 μm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, tampão borato de sódio 15 mmol L^{-1} , pH 9,3 e Temp. de 25 $^{\circ}\text{C}$. A concentração de cada enantiômero da IRD na amostra analisada foi 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Após a otimização das condições analíticas, a enantioseparação foi realizada utilizando um capilar de sílica fundida não revestido internamente, com diâmetro interno de 50 μm , 50 cm de comprimento efetivo, empregando solução tampão borato de sódio 15 mmol L^{-1} pH 9,3 adicionado de 2,5 % de SBE- β -CD como eletrólito de corrida, 30 kV de tensão e detecção em 239 nm. As outras condições empregadas foram: injeção hidrodinâmica (pressão de 50 mbar por 7,5 s e temperatura do capilar de 25 $^{\circ}\text{C}$). Nestas condições foi obtida uma resolução de 5,9, com tempo de migração de 6,5 min. para a (-)-(R)-IRD e 6,8 min para a (+)-(S)-IRD (figura 3.7).

Para estabelecer a ordem de migração, os enantiômeros puros da IRD (obtidos pela análise semipreparativa nas condições estabelecidas por Rask, Angelo e Christensen (1998)) foram analisados utilizando o procedimento analítico descrito acima e a ordem de migração estabelecida, sendo o primeiro enantiômero a migrar a (-)-(R)-IRD e o segundo a (+)-(S)-IRD.

Figura 3.7. Eletroferograma referente à análise dos enantiômeros da IRD e da impureza D. (1) impureza D; (2) (-)-(R)-IRD e (3) (+)-(S)-IRD. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida com 50 μm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento efetivo, tampão borato de sódio 15 mmol L^{-1} , pH 9,3, tensão de 30 kV, Temp. 25 $^{\circ}\text{C}$, porcentagem de SBE- β -CD de 2,5 %. A concentração de cada enantiômero da IRD na amostra analisada foi 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2. Validação do Método

➤ Estabilidade no auto-injetor e *system suitability*

A tabela 3.2 mostra os resultados obtidos na avaliação da estabilidade das soluções padrão dos enantiômeros da IRD em intervalos de tempo diferentes no auto-injetor. Os valores de CV (%) obtidos foram de 2,9 e 3,3 % para o (-)-(R)-IRD e (+)-(S)-IRD, respectivamente. Os dados obtidos nesses experimentos mostram que o padrão foi estável até 8 h no auto-injetor, pois não foram observadas diferenças significativas das médias (valor de $p > 0,05$). Assim, os enantiômeros da IRD foram considerados estáveis por 8 h no auto-injetor.

Tabela 3.2. Teste de estabilidade da solução padrão dos enantiômeros da IRD no auto-injetor

Tempo (h)	(-)-(R)-IRD	(+)-(S)-IRD
	% encontrada ^a	% encontrada ^a
1	101,99	102,03
2	101,43	102,45
3	94,38	94,60
4	95,62	95,39
6	97,92	97,83
8	97,84	97,00
CV (%) ^b	2,90	3,27

^a Média da análise em triplicata; ^b coeficiente de variação

O teste de *system suitability* do sistema eletroforético foi realizado antes de se executar a validação. Oito replicatas de injeções de soluções padrão foram feitas e o tempo de migração, fator de cauda, número de pratos e resolução foram determinados. Em todas as análises a resolução foi maior do que 2,0, o número de pratos foi de aproximadamente 200.000, o fator de cauda foi menor do que 2 e o CV (%) do tempo de migração foi menor do que 2,0 % (tabela 3.3). Assim, o sistema foi considerado adequado para a realização das análises.

Tabela 3.3. Resultados do teste *system suitability* para a análise dos enantiômeros da IRD

Parâmetro	Valor Recomendado USP para HPLC	Dia	Valor Mínimo	Valor Máximo	CV (%)
(-)-(R)-IRD			n = 8 ^a		
Tempo de Migração	CV (%) ^b < 2	1	6,32	6,62	1,8
		2	6,50	6,64	0,7
Fator de cauda (TF)	TF < 2	1	0,82	1,05	7,8
		2	0,81	0,99	6,1
Número de Pratos	Valores > 2.000	1	224.216	239.540	2,7
		2	187.441	205.725	3,7
(+)-(S)-IRD			n = 8 ^a		
Tempo de Migração	CV (%) ^b < 2	1	6,58	6,93	1,9
		2	6,79	6,95	0,8
Fator de cauda (TF)	TF < 2	1	0,73	0,90	6,5
		2	0,75	0,93	7,9
Número de Pratos	Valores > 2.000	1	233.716	291.672	7,9
		2	218.201	254.807	5,5
Resolução	Valores > 2	1	5,12	5,37	3,9
		2	5,06	5,40	1,5

^a Valores referentes a análise de oito replicatas; ^b coeficiente de variação

➤ Seletividade

Conforme pode-se verificar na figura 3.8A–D, após a realização das análises nas amostras de padrão submetidas ao estudo de estabilidade, o método demonstrou ser seletivo para os enantiômeros da IRD, pois nenhum interferente/produto de degradação foi detectado no tempo de migração dos enantiômeros. Observa-se também que nas condições de estresse, tais como ácido, base, peróxido de hidrogênio e luz UV, não houve interferência significativa na resolução de enantiômeros. Adicionalmente, a pureza dos picos da solução padrão (n = 3, para 200 µg mL⁻¹ da mistura racêmica) e amostras após degradação (n = 3) foram comparados, apresentando valores de 99,95 %, mostrando não haver co-migração de outro

produto. Mesmo sendo a impureza D, uma impureza passível de ocorrer, devido à fotodegradação da IRD, esta não foi observada nos eletroferogramas.

Figura 3.8. Eletroferogramas típicos de IRD depois de: (A) fotodegradação - UV 254 nm; (B) hidrólise básica; (C) hidrólise ácida; (D) degradação oxidativa. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de diâmetro interno de 50 μm e 50 cm de comprimento efetivo, solução tampão borato de sódio 15 mmol L^{-1} , pH 9,3 contendo 2,5 % de SBE- β -CD, como eletrólito de corrida, tensão de 30 kV, Temp. de 25 $^{\circ}\text{C}$, detecção em 239 nm; injeção (50 mbar por 7,5 s). Amostras analisadas após 240 min de incubação.

➤ Linearidade

As curvas de calibração realizadas apresentaram linearidade no intervalo de 25 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada enantiômero da IRD. A tabela 2.4 apresenta as equações lineares e respectivos coeficientes de correlação linear (r) das curvas analíticas para os enantiômeros da IRD. Os valores dos coeficientes de correlação foram de 0,997, para ambos enantiômeros. A validade estatística dos valores experimentais obtidos para as curvas analíticas foi avaliada pela análise de variância (ANOVA, *Lack of fit*), mostrando que não houve desvio de linearidade, pois os valores de p foram maiores que 0,05 e F menores que 3,0. A análise de variância apresentados foi realizada pelo programa estatístico Minitab Release versão 14 (State College, Pennsylvania, EUA).

Tabela 3.4. Linearidade, limite de detecção e quantificação do método

Enantiômero	LD ^a	LQ ^a	Equação Linear ^b	Intervalo	r ^c	ANOVA <i>lack of fit</i>	
						Valor de (F)	Valor de (p)
(-)-(R)-IRD	4,27	12,93	$y = 0,19x - 0,10$	25 - 150	0,997	1,05	0,40
(+)-(S)-IRD	4,25	12,88	$y = 0,20x - 0,37$	25 - 150	0,997	0,36	0,78

^a Valores expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$; ^b Curva de calibração analítica foram preparadas em triplicatas ($n = 3$) para as concentrações de 25, 50, 75, 100 and 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos enantiômeros da IRD; $y = ax + b$, em que y é a área do pico do analito, a é o coeficiente angular, b é o coeficiente linear e x é a concentração da solução medida em $\mu\text{g mL}^{-1}$; ^c Coeficiente de correlação

➤ LD e LQ

O LD e LQ do método eletroforético foram calculados baseados nos parâmetros da curva analítica e foram de 4,2 e 12,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para ambos enantiômeros da IRD. Os valores são apresentados na tabela 3.4.

➤ Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas pelo cálculo do CV (%) e o erro relativo (ER, %), respectivamente, para três determinações dos enantiômeros da IRD em três níveis de concentração (baixo, médio e alto) em dois dias diferentes sob as mesmas condições de análise. A tabela 3.5 mostra os resultados dos ensaios intra-dia e inter-dia. Estes resultados confirmam que a precisão e exatidão do método estão dentro dos limites recomendados pelos órgãos reguladores.

Tabela 3.5. Precisão e exatidão do método de análise dos enantiômeros da IRD

Parâmetros	(-)-(R)-IRD			(+)-(S)-IRD		
Concentração Nominal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	50,00	100,00	150,00	50,00	100,00	150,00
Intra-dia ($n^a = 3$)						
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	51,93	99,66	150,93	50,57	100,57	149,81
Precisão (CV, %) ^b	3,87	2,66	2,72	4,52	3,50	3,16
Exatidão (ER, %) ^c	3,86	-0,34	0,62	3,15	0,57	- 0,13
Inter-dia ($n^d = 2$)						
Concentração analisada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	51,97	98,39	151,32	50,72	99,97	151,33
Precisão (CV, %)	3,46	4,60	1,65	2,99	2,87	1,42
Exatidão (ER, %)	3,95	-1,61	0,88	1,44	-0,03	0,89

^a n = número de determinações; ^b coeficiente de variação; ^c erro relativo; ^d n = número de dias

➤ Robustez

Na determinação da robustez do método, a significância dos efeitos foi avaliada pela análise fatorial plotada no gráfico de Pareto. As respostas obtidas foram processadas pelo *software* estatístico Minitab 14 (State College, Pennsylvania, EUA).

A variação da temperatura e do pH do eletrólito interferiram de forma significativa no tempo de migração dos enantiômeros da IRD, como mostrado para o (+)-(S)-IRD na figura 3.9 D, o que deixa claro que estes parâmetros devem ser controlados durante as análises. Entretanto, os outros parâmetros avaliados não afetaram de maneira significativa a determinação das concentrações dos enantiômeros da IRD (figuras 3.9A e 3.9B) nem a resolução entre eles (figura 3.9C).

Figura 3.9. Gráfico de Pareto representando os efeitos das variáveis e suas interações na: (A) área (-)-(R)-IRD; (B) área (+)-(S)-IRD; (C) resolução entre (-)-(R)-IRD e (+)-(S)-IRD; (D) tempo de migração de (+)-(S)-IRD.

4.3. Aplicações do Método

4.3.1. Estudo de Estabilidade

O padrão de IRD foi incubado em solução de HCl 0,08 mol L⁻¹ por 1440 min. e apresentou sensibilidade a esta solução. O fármaco sofreu degradação gradual ao longo do tempo. Após 15 min. uma ligeira degradação foi observada, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparado com o tempo zero (amostra recém-preparada). A percentagem de degradação foi de 19,57 % para (-)-(R)-IRD e 20,76 % para (+)-(S)-IRD no tempo de 240 min e no tempo de 1440 min uma maior degradação foi observada, 74,53 % para o (-)-(R)-IRD e 74,44 % para (+)-(S)-IRD). Em ambos os períodos, 240 e 1440 min, a degradação sofrida pelo fármaco apresentou uma diferença estatística significativa (valores de $p < 0,001$) quando comparado a amostras recém-preparadas (figura 3.10).

Figura 3.10. Estudo de degradação dos enantiômeros da IRD (200 µg mL⁻¹ da mistura racêmica) pela exposição a condição ácida. Cada barra representa a média ± erro padrão médio (E.P.M.). Os símbolos adjacentes à barra representam o valor de p com nível de significância de 95 %, (*one-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) quando comparado com a amostra fresca. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Sob condições alcalinas, foi observada uma degradação dos enantiômeros da IRD com diferença estatística significativa ($p < 0,001$) logo após 15 min. de incubação. Esta percentagem de degradação foi semelhante até o minuto 240, em que percentagens de degradação para os enantiômeros da IRD foram de 50,18 % para a (-)-(R)-IRD e 50,01 % para

(+)-(S)-IRD. Após este tempo, apenas 7,88 % da (-)-(R)-IRD e 8,86 % da (+)-(S)-IRD não haviam sofrido degradação, como pode ser observado na figura 3.11.

Figura 3.11. Estudo de degradação dos enantiômeros da IRD ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura racêmica) pela exposição a condição alcalina. Cada barra representa a média $\pm$ E.P.M. Os símbolos adjacentes à barra representam o valor de p , com nível de significância de 95 %, (*one-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) quando comparado com a amostra fresca. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

De acordo com os dados da literatura, a IRD é mais estável em condições ácidas do que em condições alcalinas (BARTLETT et al., 1998). A classe das 1,4-DHP é susceptível à degradação oxidativa quando expostas ao peróxido de hidrogênio, o que resulta na formação de um análogo de piridina (impureza D). O mesmo composto é formado quando a classe 1,4-DHP é exposta à luz (FAKHARI et al., 2008). Após 240 min, a IRD foi mais instável sob condições oxidativas do que sob condições ácidas e alcalinas. Sob condições oxidativas, a percentagem de degradação foi 65,52 % para (-)-(R)-IRD e 65,07 % para (+)-(S)-IRD (figura 3.12). Esta degradação se manteve até o término da exposição (1440 min) ($p > 0,05$).

Figura 3.12. Estudo de degradação dos enantiômeros da IRD ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura racêmica) pela exposição a degradação oxidativa. Cada barra representa a média $\pm$ E.P.M. Os símbolos adjacentes à barra representam o valor de p , com nível de significância de 95 %, (*one-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) quando comparado com a amostra fresca. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A IRD é fotossensível em solução, assim como todos os compostos da classe 1,4-DHP (BARANDA et al., 2006; FAKHARI et al., 2008). Diferença estatística significativa em 24 horas de estudo ($p > 0,05$) foi observada, em que a exposição à radiação UV causou 28,02 % de degradação para a (-)-(R)-IRD e 21,96 % para a (+)-(S)-IRD (figura 3.13). Devido à ausência do produto de fotodegradação, a impureza D, até a 24^a hora, o estudo foi realizado até a 96^a hora, para verificar a formação da impureza D. Após este período de tempo, foi observada 64,11 % de degradação para a (-)-(R)-IRD e 62,53 % para a (+)-(S)-IRD. Porém, ao final da 96^a hora nenhum pico referente à impureza D foi detectado, o que pode ser explicado pela baixa formação deste composto e/ou a formação de outros compostos não passíveis de detecção pelo método aqui apresentado.

Figura 3.13. Estudo de fotodegradação dos enantiômeros da IRD em solução metanólica ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$ da mistura racêmica). Cada barra representa a média $\pm$ E.P.M. Os símbolos adjacentes à barra representam o valor de p, com nível de significância de 95 %, (*one-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) quando comparado com a amostra fresca. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.2. Análise de Formulação Farmacêutica

O método proposto foi aplicado para determinação de enantiômeros da IRD em cápsulas disponíveis comercialmente. Os resultados obtidos foram satisfatórios em termos de exatidão e precisão, como indicado pelos valores de erro relativo (ER, %) e do coeficiente de variação (CV, %) (tabela 3.6).

Tabela 3.6. Determinação dos enantiômeros da IRD em cápsulas

Dia 1						
Cápsulas de IRD (5 mg) ^a						
Lote	(-)-(R)-IRD			(+)-(S)-IRD		
	% encontrada ^b	CV (%) ^c	ER (%) ^d	% encontrada ^b	CV (%) ^c	ER (%) ^d
1	97,71	0,38	-0,02	98,12	0,28	-0,02
2	100,72	3,88	0,01	100,91	2,73	0,01
Dia 2						
Cápsulas de IRD (5 mg) ^a						
Lote	(-)-(R)-IRD			(+)-(S)-IRD		
	% encontrada ^b	CV (%) ^c	ER (%) ^d	% encontrada ^b	CV (%) ^c	ER (%) ^d
1	101,64	0,87	-0,99	101,49	1,45	0,02
2	102,04	0,81	-0,99	98,72	4,14	-0,01

^a Especificação do fabricante – mistura racêmica; ^b Média da análise de três replicatas; ^c coeficiente de variação; ^d erro relativo

Os excipientes das cápsulas de IRD não interferiram na análise (figura 3.14) e a quantificação está em acordo com o rotulado pelo fabricante.

Figura 3.14. Eletroferograma obtido na análise das cápsulas de IRD. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida não revestido internamente, com diâmetro interno de 50 μm , 50 cm de comprimento efetivo, empregando solução tampão borato de sódio 15 mmol L^{-1} pH 9,3 adicionado de 2,5 % de SBE- β -CD como eletrólito de corrida, 30 kV de tensão e detecção em 239 nm. As outras condições empregadas foram: injeção hidrodinâmica (pressão de 50 mbar por 7,5 s e Temp. do capilar de 25 $^{\circ}\text{C}$).

5. COMENTÁRIOS FINAIS

Este capítulo descreve o emprego da eletroforese capilar para a análise enantiosseletiva da IRD, sendo este, até o momento, o primeiro método descrito na literatura utilizando esta técnica. O método desenvolvido e validado mostrou ser simples, rápido, fácil e eficiente para análise dos enantiômeros da IRD por CE usando a SBE- β -CD como seletor quiral. A completa separação dos enantiômeros ($R_s = 5,9$) e da impureza D foi obtida em 7 min. O desempenho analítico, em relação aos parâmetros linearidade, LQ, LD, precisão, exatidão, robustez e seletividade, estão de acordo com as exigências da ANVISA. O método foi aplicado em estudos de estabilidade e demonstrou que ambos enantiômeros da IRD são sensíveis às condições de estresse. Além disso, o método foi aplicado para análise dos enantiômeros da IRD em formulações farmacêuticas podendo ser utilizado rotineiramente na indústria farmacêutica como uma alternativa aos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL AZZAM, K. M. et al. Enantioselective analysis of ofloxacin and ornidazole in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis using single chiral selector and computational calculation of their inclusion complexes. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, n. 2, p. 249-255, Aug 2010. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281297300017 >.

_____. Stability-indicating micellar electrokinetic chromatography method for the analysis of sumatriptan succinate in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 5, p. 937-943, Dec 2011. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295304100011 >.

BARANDA, A. B. et al. Instability of calcium channel antagonists during sample preparation for LC-MS-MS analysis of serum samples. **Forensic Science International**, v. 156, n. 1, p. 23-34, Jan 2006. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235310300004 >.

BARBATO, F. et al. Enantioselective retention of 4-aryl-1,4-dihydropyridine calcium-channel blockers on human serum albumin and alpha(1)-acid glycoprotein HPLC columns: Relationships with different scales of lipophilicity. **Helvetica Chimica Acta**, v. 83, n. 4, p. 767-776, 2000. ISSN 0018-019X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086704300011 >.

BARTLETT, M. G. et al. Determination of degradation products from the calcium-channel blocker isradipine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, n. 3, p. 335-345, Nov 1998. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000077399900005 >.

BIDOUIL, S.; DUBOIS, J.; HANOCQ, M. Isocratic high-performance liquid chromatographic method for the separation of isradipine and its main metabolites Application to in vitro metabolism by h3A4/OR cells. **Journal of Chromatography B**, v. 693, n. 2, p. 359-366, Jun 1997. ISSN 0378-4347. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XE51900014 >.

BLANCO, M.; VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 428-439, Jul-Aug 2003. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184465600012 >.

BOATTO, G. et al. Enantiomeric separation by HPLC of 1,4-dihydropyridines with vancomycin as chiral selector. **Chirality**, v. 15, n. 6, p. 494-497, Jun 2003. ISSN 0899-0042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000183714600003 >.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Genéricos-Legislação-Resolução-RE. no. 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&mode=PRINT_VERSION. Acesso em 1 de novembro de 2011.

CARDENAS, A. M. et al. Sodium-dependent inhibition by PN200-110 enantiomers of nicotinic adrenal catecholamine release. **British Journal of Pharmacology**, v. 95, n. 1, p. 9-14, Sep 1988. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988P921100003 >.

CHRISTENSEN, H. R. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of isradipine after oral and intravenous administration: Half-life shorter than expected? **Pharmacology & Toxicology**, v. 86, n. 4, p. 178-182, Apr 2000. ISSN 0901-9928. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086332500005 >.

CHRISTIANS, T.; HOLZGRABE, U. Enantioseparation of dihydropyridine derivatives by means of neutral and negatively charged beta-cyclodextrin derivatives using capillary electrophoresis.

Electrophoresis, v. 21, n. 17, p. 3609-3617, Nov 2000. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165619500011 >.

DOAT, M. et al. Cardiac function improvement 24 hours after Isradipine SRO in patients with chronic stable angina: A double-blind randomized study. **Acta Cardiologica**, v. 51, n. 2, p. 155-164, 1996. ISSN 0001-5385. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996UH41900004 >.

FAKHARI, A. R. et al. Development of a stability-indicating CE assay for the determination of amlodipine enantiomers in commercial tablets. **Electrophoresis**, v. 29, n. 22, p. 4583-4592, Nov 2008. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261741100017 >.

FANALI, S. Controlling enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with inclusion-complexation. **Journal of Chromatography A**, v. 792, n. 1-2, p. 227-267, Dec 1997. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000071584900018 >.

_____. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. **Journal of Chromatography A**, v. 875, n. 1-2, p. 89-122, Apr 2000. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086738800005 >.

FANALI, S.; ATURKI, Z.; DESIDERIO, C. New strategies for chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 92, n. 2-3, p. 137-155, Apr 1998. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000073626800005 >.

GILAR, M.; UHROVA, M.; TESAROVA, E. Enantiomer separation of dihydropyridine calcium antagonists with cyclodextrins as chiral selectors: Structural correlation. **Journal of Chromatography B-Biomedical Applications**, v. 681, n. 1, p. 133-141, May 1996. ISSN 0378-4347. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996UQ82200017 >.

HANDROCK, R. et al. Dihydropyridine enantiomers block recombinant L-type Ca²⁺ channels by two different mechanisms. **Journal of Physiology-London**, v. 521, n. 1, p. 31-42, Nov 1999. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000084222700004 >.

HEUERMANN, M.; BLASCHKE, G. Chiral separation of basic drugs using cyclodextrins as chiral pseudo-stationary phases in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 648, n. 1, p. 267-274, Oct 1993. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993MB15900030 >.

HOF, R. P. et al. Stereoselectivity at the calcium-channel - different profiles of hemodynamic activity of the enantiomers of the dihydropyridine derivative PN-200-110. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 8, n. 2, p. 221-226, 1986. ISSN 0160-2446. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986A612600001 >.

LINDNER, W.; BOHS, B.; SEIDEL, V. Enantioselective capillary electrophoresis of amino-acid derivatives on cyclodextrin - evaluation of structure resolution relationships. **Journal of Chromatography A**, v. 697, n. 1-2, p. 549-560, Apr 1995. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995QW21300063 >.

OKAMOTO, Y. et al. Optical resolution of dihydropyridine enantiomers by high-performance liquid-chromatography using phenylcarbamates of polysaccharides as a chiral stationary phase. **Journal of Chromatography**, v. 513, p. 375-378, Jul 1990. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990DU78300042 >.

RASK, H. S.; ANGELO, H. R.; CHRISTENSEN, H. R. Enantioselective determination of isradipine in human serum using chiral stationary phase liquid chromatography and gas chromatography with nitrogen selective detection. **Chirality**, v. 10, n. 9, p. 808-812, 1998. ISSN 0899-0042. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000077073600006 >.

RIZZI, A. Fundamental aspects of chiral separations by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 22, n. 15, p. 3079-3106, Sep 2001. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171365800002 >.

TAGLIARO, F. et al. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 92, n. 2-3, p. 75-88, Apr 1998. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000073626800002 >.

TAGLIARO, F.; TURRINA, S.; SMITH, F. P. Capillary electrophoresis: Principles and applications in illicit drug analysis. **Forensic Science International**, v. 77, n. 3, p. 211-229, Feb 1996. ISSN 0379-0738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996TZ20600008 >.

WALTON, T.; SYMES, L. R. Felodipine and isradipine - new calcium-channel-blocking agents for the treatment of hypertension. **Clinical Pharmacy**, v. 12, n. 4, p. 261-275, Apr 1993. ISSN 0278-2677. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993KV23200007 >.

WEINBERGER, R. Capillary Zone Electrophoresis Basic Concepts. In: WEINBERGER, R. (Ed.). **Practical Capillary Electrophoresis**. Second. USA: Academic Press, 2000. cap. 2, p.25-72. ISBN 978-0127423562.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho a técnica de CE foi empregada na determinação da proteína $\alpha 1$ -AGP em plasma de pacientes com sepse e da proteína IFN α -2a em formulação farmacêutica, assim como para a análise enantiosseletiva do fármaco isradipina.

Na análise da $\alpha 1$ -AGP em amostras de plasma foi possível a quantificação de diferentes glicofomas desta proteína com valores confiáveis e desempenho analítico, em relação aos parâmetros avaliados, dentro do intervalo recomendado. A partir da aplicação do método em plasma de pacientes foi observado mudanças na quantificação das glicofomas da proteína entre voluntários sadios, pacientes com sepse grave e choque séptico. Isto pode ter implicações nas funções da $\alpha 1$ -AGP, o que possibilita a realização de estudos farmacológicos adicionais. A CE tem sido uma escolha importante para a análise de glicoproteína, devido à sua rápida separação, alta resolução e potencial em fornecer informação adicional sobre glicoproteínas farmacêuticas.

Para a análise do IFN α -2a os resultados obtidos a partir do desenvolvimento do método mostraram tempo relativamente curto de análise e a validação forneceu método com suficiente seletividade, precisão, exatidão e detectabilidade para a determinação do biofármacos na finalidade pretendida. Este método foi aplicado na análise do biofármaco em formulações farmacêuticas apresentando resultados dentro do intervalo preconizado pelo fabricante e órgãos regulamentadores. Este estudo é o primeiro relato de um método totalmente validado empregando a técnica CE em solução livre para análise do IFN α -2a, vindo a contribuir para melhorar o controle de qualidade, de forma a garantir maior segurança e eficácia do produto.

Na análise enantiosseletiva dos enantiômeros da IRD o método desenvolvido e validado mostrou ser simples, rápido e eficiente, com completa separação dos enantiômeros em menos de 7 min, sendo este método de quantificação dos enantiômeros da IRD por CE inédito. O método foi aplicado na análise quantitativa dos enantiômeros da IRD em formulações farmacêuticas e em estudos de estresse, mostrando que os enantiômeros da IRD sofrem maior degradação sob condições alcalinas, frente às demais condições estudadas.

Esta avaliação mostra claramente que a CE apresenta reais vantagens em relação aos métodos cromatográficos no campo da análise avançada, incluindo quiral, quantificação, identificação e aplicação. Portanto, as informações aqui apresentadas colocam a CE como parte integrante da investigação farmacêutica devido à sua enorme versatilidade, simplicidade de uso, qualidade de dados e custo. A CE mostrou-se particularmente interessante, devido ao baixo custo dos métodos decorrente, principalmente, da reduzida quantidade de reagentes usados e por fornecer métodos com suficiente resolução, seletividade, precisão, exatidão e

detectabilidade para as determinações dos compostos relacionados. Desta forma, sugere-se que a versatilidade da CE fornece uma ferramenta extremamente poderosa para obter informações quantitativas e qualitativas em todas as áreas de descoberta de fármacos, onde a técnica de HPLC já está bem estabelecida, incluindo proteômica, metabolômica e tecnologias de biomarcadores.

ANEXO I, Tabela - Diagnósticos clínicos, dados demográficos e índice prognóstico dos pacientes estudados.

Paciente	Diagnóstico infeccioso	Comorbidades	Agente Etiológico	Sexo	Idade (anos)	AP II
18	*Pielonefrite	Nenhuma	Não identificado	F	81	13
22	*Infecção do Trato Urinário	Colostomia e Aneurisma	Fungos leveduriformes	F	78	13
43	*Gastroenterite	Depressão e Fribromialgia	Não identificado	F	58	9
47	*Pneumonia	Anemia Falciforme	Não identificado	M	63	25
51	†Pielonefrite	Nefrolitíase	<i>E. coli</i>	F	68	17
MÉDIA					69,6	15,4

AP II = Índice prognóstico APACHE II. *pacientes com sepse grave; † paciente com choque séptico.

ANEXO II, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da Pesquisa: “Aplicação da Eletroforese Capilar para a análise de proteínas (Interferon alfa – IFN- α e α 1-glicoproteína ácida – α 1-AGP)”

Pesquisadores responsáveis:

- **Prof^a. Dr^a. Cristiane Masetto de Gaitani** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP – Departamento de Ciências Farmacêuticas – Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos – Tel.: (16) 3602-4882; e-mail: crisgai@fcrp.usp.br (Coordenadora do projeto e orientadora do aluno de Pós-Graduação)
- **Fernando Armani Aguiar** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP – Departamento de Ciências Farmacêuticas – Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos – Tel.: (16) 3602-4727; e-mail: fndarmani@fcrp.usp.br (Pós-Graduando - Pesquisador Responsável)
- **Prof. Dr. José Fernando de Castro Figueiredo** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP – Departamento de Clínica Médica – Divisão de Moléstias Infecciosas e Tropicais – Tel.: (16) 3602-2468; e-mail: jfcfigue@fmrp.usp.br (Responsável Clínico)
- **Maíra Peres Ferreira** - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP – Departamento de Clínica Médica – Divisão de Moléstias Infecciosas e Tropicais Tel.: (16) 3941-2416 e-mail: maira@fcrp.usp.br (Pós-Graduanda)

➤ **Informações para o paciente**

O tratamento da hepatite C com interferon alfa associado com a ribavirina promove a eliminação do vírus da hepatite C somente em parte dos pacientes tratados. As razões para estas diferenças no resultado do tratamento não são totalmente conhecidas. Por este motivo, estamos convidando o(a) senhor(a) para participar do estudo denominado “*Aplicação da eletroforese capilar para a análise de proteínas (Interferon alfa – IFN- α e α 1-glicoproteína ácida – α 1-AGP)*” com o objetivo de quantificar o IFN- α por eletroforese capilar em material biológico (sangue) para, assim, saber se o medicamento está presente no sangue em quantidade suficiente para atuar no organismo, e por quanto tempo permanece na circulação.

Caso concorde em participar, além de manter toda a rotina do seu atendimento habitual no ambulatório de hepatites, quando são realizados os exames de sangue indicados rotineiramente para o acompanhamento do seu tratamento, também serão coletadas amostras de sangue para que possamos quantificar o medicamento (interferon alfa) presente no sangue. De maneira que serão colhidos, na

rotina do seu atendimento médico, da veia do braço, uma amostra de sangue de 10 mL antes do início do tratamento, uma semana, 14 e 28 dias depois do início do mesmo. Para isso, usaremos agulha e seringa descartáveis, como é feito para os exames que são pedidos por seu médico. Uma vez submetido aos exames, este material será desprezado e não será armazenado. Todos os seus resultados, incluindo os obtidos a partir das amostras de sangue colhidas no seu atendimento médico de rotina, serão utilizados para a pesquisa. Não estão previstos benefícios aos participantes do estudo e nem haverá custos financeiros adicionais caso o(a) senhor(a) concorde em participar, uma vez que os procedimentos estão previstos para serem realizados nos dias em que o(a) senhor(a) deverá comparecer ao Hospital para as coletas habituais de sangue ou para suas consultas de rotina. Esses procedimentos não trarão risco ou problemas para sua pessoa, só o incômodo da picada da agulha e talvez alguma mancha azulada que poderá ficar, por alguns poucos dias, na pele do local de onde foi retirado o sangue. Dessa forma, não há previsão de danos decorrentes da pesquisa e, portanto, não estão previstas quaisquer formas de indenização para o(a) senhor(a).

A sua participação nesta pesquisa não modificará o seu atendimento no Ambulatório de Hepatites e o(a) senhor(a) continuará a ser atendido(a) pela mesma equipe médica do Ambulatório.

A sua participação no estudo é voluntária e caso o(a) senhor(a) não concorde em participar continuará a ser atendido(a) e tratado(a) no Hospital da mesma maneira como tem sido até agora. O seu nome será mantido em sigilo, isto é, ninguém ficará sabendo quem participou do estudo. Além disso, o(a) senhor(a) poderá pedir outros esclarecimentos aos pesquisadores responsáveis, a qualquer momento, antes ou durante o curso da pesquisa, e pedir para ser retirado(a) do estudo, mesmo depois dos exames de sangue terem sido realizados.

Eu, _____, RG nº _____ declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Ou

Eu, _____, RG nº _____,
responsável legal por _____, RG nº _____
declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____

Nome: _____

Nome: _____

RG: _____

RG: _____

_____
Assinatura do paciente_____
Assinatura da Testemunha

_____
Pesquisador Responsável: Fernando Armani Aguiar
Telefones: (16) 3602-3515 (Residência)
(16) 3602 4727 (Laboratório)

ANEXO III, Aprovação do Comitê de Ética Humano

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 30 de setembro de 2009

Ofício nº 3236/2009
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“APLICAÇÃO DA ELETROFORESE CAPILAR PARA A ANÁLISE DE PROTEÍNAS (INTERFERON ALFA-IFN- α E α 1-GLICOPROTEÍNA ÁCIDA - α 1-AGP)”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 296ª Reunião Ordinária realizada em 28/09/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 8708/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

FERNANDO ARMANI AGUIAR

PROFª DRª CRISTIANE MASETTO DE GAITANI (Orientadora)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

Depto. de Ciências Farmacêuticas

ANEXO IV, Cálculo do APACHE II

Centro de Terapia Intensiva
Hospital das Clínicas - CAMPUS

APACHE II

NOME:

RG HCFMRP

Idade: anos

Variável Fisiológica:	Pontos
Temperatura	°C
PA Sistólica	mmHg
PA Diastólica	mmHg
PAM	mmHg
F. Cardíaca	bpm
Ph arterial	
Fi O2	%
Pa O2	mmHg
Pa CO2	mmHg
Oxigenação	

Doença Crônica:	Presente:	____	____
	Cirúrgica:	____	____
	PO urg.:	____	____
	PO eletivo:	____	____

Peso de Classe Diagnóstica

DATA DE INTERNAÇÃO NO CTI:

Variável Fisiológica:	Pontos
F. Respiratória	ipm
Na	mEq/mL
K	mEq/mL
Creatinina	mg%
Insuf. Renal Aguda	
GB	x 1000
Hematócrito	%

Escala de Glasgow: pontos

Pós Operatório de Urgência:

Valor APACHE II

Log R/(1-R)
Exponencial de R/(1-R)
R/(1-R)

EVOLUÇÃO:

Preenchido por:

Data da alta/ óbito:

RISCO DE ÓBITO: