UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise enantiosseletiva da fluvastatina em plasma
por eletroforese capilar**

Jennifer Michiko Chauca Yokoya

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise enantiosseletiva da fluvastatina em plasma
por eletroforese capilar**

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Jennifer Michiko Chauca
Yokoya

Orientadora: Prof. Dra. Cristiane Masetto
de Gaitani

Ribeirão Preto
2013

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

Yokoya, Jennifer Michiko Chauca

Análise enantiosseletiva da fluvastatina em plasma por eletroforese capilar. Ribeirão Preto, 2013.

100 p.; 30cm.

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

Orientador: Gaitani, Cristiane Masetto de.

1. Análise enantiosseletiva. 2. Eletroforese capilar. 3. Fluvastatina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jennifer Michiko Chauca Yokoya

Análise enantiosseletiva da fluvastatina em plasma por eletroforese capilar

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientadora: Prof. Dra. Cristiane Masetto
de Gaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Clara Esther Chauca Rodriguez e Nobushige Yokoya, pelo incentivo, por todo o suporte que precisei, incondicionalmente, e por entenderem os inúmeros momentos que precisei estar ausente de nossa família

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Prof. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani, por ter me orientado, por sua dedicação, atenção, incentivo, paciência e confiança em mim depositada ao longo da realização deste trabalho. Muito obrigada pela oportunidade e pelo aprendizado, Cris!

Ao Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, em especial à Dra. Eugênia Maria Amorim Ubiali, Coordenadora Médica do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela atenção e pela permissão em nos ceder o plasma utilizado neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da FCFRP-USP - tanto por aqueles que passaram pelo lab, e por aqueles que estão iniciando suas jornadas - pelas discussões científicas, momentos de descontração e pela compreensão principalmente na fase final do meu trabalho: Alyne Galvão, Ana Débora Pinheiro, Anielise Russo (minha aluna de IC), Bruna Moreira, Fernando Armani, Greyce Steinhorst, Lanuze Toni, Letícia Schiave, Luciana Lourenço, Luiz Fernando da Silva: obrigada por tudo! E um agradecimento muito mais que especial à Aline Ishikawa - por sua imensa ajuda em um momento que nada parecia dar certo, por sua valiosa amizade, a enorme paciência, e por dar aquele *up* quando as minhas forças eram quase nulas - Luiza Barros e Rodrigo Moreira – os conselhos de vocês foram fundamentais em muitos momentos, obrigada pelo carinho, pela paciência, pelos vários momentos de descontração, e pela força que vocês me deram nesses alguns meses que foram suficientes para estreitar os nossos laços de amizade. Contem comigo sempre!

À Prof. Dra. Pierina Sueli Bonato, por permitir o uso da infra-estrutura de seu laboratório de pesquisa – CROEC – e às técnicas Valquíria Aparecida Polisel Jabor e Luciana Angulo de Faria, pela atenção.

Aos Prof. Drs. Ana Amélia Carraro Abrahão, Ana Maria de Souza, Ana Patrícia Yatsuda Natsui, Cleni Mara Marzocchi Machado, Fabíola Attié de Castro, José Clóvis do Prado Júnior, Maria Regina Torqueti e Sérgio de Albuquerque, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP, pela compreensão.

Ao Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira, do Departamento de Química da FFCLRP, por suas sugestões, por me permitir usar em alguns momentos de emergência, o seu laboratório de pesquisa, e por suas valiosas contribuições.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, do Departamento de Química da FFCLRP, por sua atenção e suas valiosíssimas sugestões em um momento muito difícil na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Zeki Naal, sempre disposto a responder algumas de minhas mais angustiantes dúvidas de Química, não só na graduação, mas logo antes do meu exame de ingresso no mestrado, por suas sugestões ao longo da execução deste trabalho, e inclusive no exame de qualificação. Muito obrigada por sua atenção!

À Adriana Rocha, pela atenção, dicas e sugestões nos procedimentos de extração. Ao Eduardo Coelho, pela paciência e atenção quando precisei realizar alguns testes, e pelo auxílio quando tive algumas dúvidas.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela atenção.

Aos técnicos colegas de trabalho – e amigos – Aline Carolina da Costa Lemos, Ieda Maria Razaboni Prado, Ivelise Bajona Gavarrom, José Eduardo Cavalcanti Del Lama, Luciana Ambrósio e Luiz Chaim, Ludmila Tonani, Máira Peres Ferreira, Solange Aparecida Fernandes Bocardo. Obrigada por eu poder contar com vocês, pelo incentivo, pelo suporte e pelos muitos momentos de desabafo.

Aos meus queridos amigos, alguns fisicamente distantes, mas todos sempre dentro do meu coração e que não posso deixar de os mencionar: Danilo Menaldo, Fernanda Bell, Flávia Paina, Helen Fumagalli, Luiz Miguel Pereira, Karina Toledo, Márcia Rampin, Natália Moraes, Neila Canineo, Rodrigo Gonçalves (Barba), Vanessa Zampol, Verônica Higa, Wellington Leite, Willian

Silveira – Obrigada por compartilharem um pouco da alegria de vocês nos momentos que eu mais precisei, vocês não tem idéia do quanto vocês são imensamente importantes para mim!

A todos aqueles que, de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos!

À FAPESP, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

"Until one is committed, there is hesitancy, the chance to draw back, always ineffectiveness concerning all acts of initiative and creation. There is one elementary truth, the ignorance of which kills countless ideas and splendid plans; that the moment one definitely commits oneself, then providence moves too. All sorts of things occur to help one that would never otherwise have occurred. A whole stream of events issues from the decision raising in one's favor all manner of unforeseen events, meetings and material assistance which no one could have dreamed would have come their way. I have learned a deep respect for one of Goethe's couplets: "Whatever you can do or dream you can, begin it. Boldness has genius, power and magic in it. Begin it now!"

W.H. Murry

RESUMO

YOKOYA, J.M.C. **Análise enantiosseletiva da fluvastatina em plasma por eletroforese capilar**. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Atualmente, as doenças cardiovasculares constituem as principais causas de morte no Brasil e no mundo. As estatinas são consideradas os agentes mais efetivos e mais bem tolerados para o tratamento do aumento excessivo dos níveis de colesterol no sangue, ou hipercolesterolemia. A fluvastatina (FLV), um fármaco hipolipêmico, de segunda geração, pertencente à classe das estatinas, e é comercializada como mistura racêmica, ou seja, uma mistura equimolar da (+)-3R, 5S-FLV e (-)-3S, 5R-FLV. Além disso, é descrito na literatura que o enantiômero (+)-3R, 5S- FLV possui atividade cerca de trinta vezes maior do que seu antípoda, o que justifica a importância e necessidade de métodos para análise enantiosseletiva de fármacos que possuam um ou mais centros de assimetria. Assim, este trabalho teve como objetivo a extração dos enantiômeros da FLV de matriz biológica (plasma) utilizando uma técnica de eletromigração em capilar, a cromatografia eletrocínética (EKC). A análise da FLV por cromatografia eletrocínética empregou como técnica de concentração *online* o *stacking* por injeção de grande volume, em um capilar de sílica fundida não revestido, de 50,0 cm de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno, solução tampão tetraborato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 9,5; adicionado de 20 mmol L^{-1} de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina como eletrólito de corrida, tensão de +25 kV, temperatura de 15 $^{\circ}\text{C}$, injeção hidrodinâmica (0,5 psi por 30 segundos) e detecção em 300 nm. A separação dos enantiômeros foi obtida com valores de resolução de 3,0 e eficiência de 255840 e 150056, e tempos de migração de 7,2 e 7,4 minutos para a (+)-3R, 5S- FLV e (-)-3S, 5R- FLV, respectivamente. O procedimento de preparo de amostra foi baseado na extração em fase sólido-líquida (SLE), com a adição de 0,5 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 em 0,5 mL de plasma, previamente fortificado com padrão de FLV. A amostra foi aplicada na coluna e depois de 15 minutos, a FLV foi eluída com 4 mL de éter etílico. O método analítico foi validado avaliando os parâmetros seletividade, linearidade, precisão e exatidão inter e intra-dia, limite de quantificação, *carry-over*, efeito matriz, integridade da diluição e estudos de estabilidade. Além disso, foi realizado o estudo de racemização. Os resultados apresentaram linearidade na faixa de concentração plasmática de 250 a 725 ng mL^{-1} para cada enantiômero, sendo o limite de quantificação a concentração de 250 ng mL^{-1} . Os estudos de precisão e exatidão apresentaram valores aceitáveis, com variação menor do que 15%. Além disso, não foi observado efeito *carry-over* e as amostras foram estáveis quando submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta e longa duração, pós-processamento e não foi observada racemização dos enantiômeros. Em relação ao efeito matriz, procedimentos alternativos foram usados com sucesso para análise de amostras lipêmicas e hemolisadas de plasmas. Sendo assim, este é o primeiro método bioanalítico desenvolvido, rápido e confiável, para quantificar os enantiômeros da FLV em amostras de plasma por EKC usando a SLE como técnica de preparo de amostra.

Palavras-chave: Fluvastatina, cromatografia eletrocínética, análise quiral, extração em fase sólido-líquida

ABSTRACT

YOKOYA, J.M.C. **Enantioselective analysis of fluvastatin in plasma by capillary electrophoresis**. 2013. 100 f. Dissertation (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Nowadays, cardiovascular diseases are the main causes of death in Brazil and worldwide. Statins are considered the most effective and well tolerated agents for the excessive increase in cholesterol blood levels, or hypercholesterolemia. Fluvastatin (FLV), a hypolipidemic second generation drug belongs to statin drug class, and it is commercialized as a racemate, that is, a equimolar mixture of (+)-3R, 5S- FLV and (-)-3S, 5R- FLV. Moreover, literature describes that (+)-3R, 5S- FLV enantiomer activity is thirty times higher than its antipode, which justifies the importance and necessity of methods for the stereoselective analysis of drugs which possess one or more than one asymmetry centers. Thus, this work aims the extraction of FLV enantiomers from a biological matrix (plasma) using one of the electromigration techniques, the EKC. FLV analysis by EKC employed large volume sample stacking as sample *on-column* concentration technique using a fused-silica capillary with 50.0 cm effective length and 75 μm internal diameter, 50 mmol L^{-1} sodium tetraborate buffer, pH 9,5 plus 20 mmol L^{-1} 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a background electrolyte, voltage of +25 kV, temperature of 15°C, with sample injected in hydrodynamic injection mode (0,5 psi for 30 seconds) and detection using a diode array detector set at 300 nm. The enantiomers resolution was achieved with a resolution value of 3.0, and efficiency of 255840 and 150056, migration times of 7.2 and 7.4 minutes for (+)-3R, 5S- FLV and (-)-3S, 5R- FLV, respectively. Supported liquid extraction was the chosen sample preparation procedure, with the addition of 0.5 mL of 0.1 mol L^{-1} pH 7.0 phosphate buffer to 0.5 mL of plasma, the mixture was applied to the column and allowed to wet for 15 minutes, 4 mL of ethyl ether was then applied to the top of the column, allowed to percolate by gravity and the eluted solvent was collected in an ambar tube, the solvent was submitted to evaporation under nitrogen flow and the residue was resuspended for injection in the capillary electrophoresis equipment. The analytical method was validated covering selectivity, linearity, within-run and between-run precision and accuracy, limit of quantification, carry-over, matrix effect, dilution integrity and stability studies parameters. The racemization study was also performed. The results support that the analytical method is linear in the range of concentrations from 250 to 725 ng mL^{-1} for each enantiomer, and the limit of quantification was 250 ng mL^{-1} ; the method is precise and accurate, with variation under 15%. Besides, no carry-over effect was observed, and both enantiomers showed to be stable under thaw and freeze cycles, short and long term stability studies, autosampler stability, and also no racemization was observed. Related to matrix effect, alternative procedures were employed successfully in case of analysis of lipemic and hemolyzed matrices. So, this is the first bioanalytical method developed, fast and reliable, to quantify FLV enantiomers in plasma samples using EKC with SLE as sample preparation procedure.

Keywords: fluvastatin, electrokinetic chromatography, chiral analysis, supported liquid extraction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema da instrumentação de CE.....	6
Figura 2 -	Comparação da EC <i>versus</i> métodos cromatográficos em fase líquida em coluna.....	10
Figura 3 -	Estrutura e tamanho das ciclodextrinas nativas.....	13
Figura 4 -	Via de biossíntese do colesterol e atuação das estatinas.....	16
Figura 5 -	Estrutura química da FLV sódica.....	17
Figura 6 -	Procedimento de LLE para análise dos enantiômeros da FLV em amostras de plasma.....	27
Figura 7 -	Procedimento de SPE para análise dos enantiômeros da FLV em amostras de plasma.....	29
Figura 8 -	Procedimento de SLE para análise dos enantiômeros da FLV em amostras de plasma.....	30
Figura 9 -	Eletroferogramas e gráfico referentes à seleção da concentração da HP- β -CD para a enantioseparação da FLV.....	41
Figura 10 -	Esquema da complexação entre íons borato e moléculas contendo grupamento diol.....	43
Figura 11 -	Reações de equilíbrio químico que ocorrem entre o soluto (S), ciclodextrina (CD) e ânion borato (B-), com a formação de complexos.....	44
Figura 12 -	Influência da concentração do eletrólito de corrida na análise dos enantiômeros da FLV.....	45
Figura 13 -	Influência do pH do eletrólito de corrida na análise dos enantiômeros da FLV.....	46
Figura 14 -	Influência da temperatura na análise dos enantiômeros da FLV.....	47
Figura 15 -	Influência da tensão na análise dos enantiômeros da FLV.....	49
Figura 16 -	Eletroferograma referente à análise dos enantiômeros da FLV.....	50
Figura 17 -	Recuperação dos enantiômeros da FLV obtida em função da variação do tipo de solvente orgânico empregado para extração por LLE.....	55
Figura 18 -	Recuperação dos enantiômeros da FLV obtidos em função da variação do pH na extração por LLE.....	57
Figura 19 -	Recuperação dos enantiômeros da FLV obtidos em função do tipo de agitação usada na LLE.....	58

Figura 20 -	Recuperação dos enantiômeros da FLV obtidos em função do tempo de extração por LLE.....	58
Figura 21 -	Recuperação dos enantiômeros da FLV em função da variação do pH de extração.....	61
Figura 22 -	Recuperação dos enantiômeros da FLV em função da quantidade de NaCl adicionada ao plasma.....	62
Figura 23 -	Eletroferograma referente à análise dos enantiômeros da FLV após extração por SLE.....	65
Figura 24 -	Eletroferograma referente à análise dos enantiômeros da FLV e PI.....	67
Figura 25 -	Concentração de amostra online por LVSS e inversão de polaridade.....	69
Figura 26 -	Eletroferograma referente à análise dos enantiômeros da FLV em amostras de plasma após extração por SLE e stacking por LVSS.....	71
Figura 27 -	Linearidade do método analítico para a (+)-3R,5S-FLV.....	75
Figura 28 -	Linearidade do método analítico para a (-)-3S,5R-FLV.....	76
Figura 29 -	Avaliação da variação da concentração plasmática das amostras dos grupos submetidos ao estudo de estabilidade em relação ao grupo controle (amostras recém-preparadas).....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Propriedades físico-químicas das CDs nativas.....	14
Tabela 2 -	Métodos para a análise dos enantiômeros da FLV em matrizes biológicas.....	20
Tabela 3 -	Condicionamento do capilar para análise dos enantiômeros da FLV.....	40
Tabela 4 -	Condições analíticas após otimização das condições para separação dos enantiômeros da FLV por EKC.....	50
Tabela 5 -	Avaliação da eletrólise da solução tampão empregada como eletrólito de corrida.....	51
Tabela 6 -	Condições analíticas otimizadas para a extração dos enantiômeros da FLV em plasma por LLE.....	59
Tabela 7 -	Recuperação dos enantiômeros da FLV em função do número de partições e do volume de solvente.....	61
Tabela 8 -	Condições analíticas otimizadas para a extração dos enantiômeros da FLV em plasma por SLE.....	65
Tabela 9 -	Condições otimizadas para separação dos enantiômeros da FLV usando LVSS como técnica de concentração <i>online</i>	70
Tabela 10 -	Valores de FMN por PI obtidos na avaliação da seletividade do método.....	72
Tabela 11 -	Linearidade e LIQ do método para análise dos enantiômeros da FLV.....	75
Tabela 12 -	Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros da FLV.....	77
Tabela 13 -	Avaliação da precisão e exatidão de amostras de plasma diluídas.....	78
Tabela 14 -	Análise de estabilidades da (+)-3R,5S-FLV e (-)-3S,5R-FLV em plasma, em diferentes concentrações.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

(-)-3S, 5R-FLV	Enantiômero (3S,5R,6E)-7-[3-(4-fluorofenil)-1-(propan-2-il)-1H-indol-2-il]-3,5- diidroxiept-6-enoato sódico
(+)-3R, 5S-FLV	Enantiômero (3R,5S,6E)-7-[3-(4-fluorofenil)-1-(propan-2-il)-1H-indol-2-il]-3,5- diidroxiept-6-enoato sódico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CD	Ciclodextrina
CE	Eletroforese capilar (<i>Capillary electrophoresis</i>)
CV, %	Coeficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodo (<i>Diode array detector</i>)
DM-β-CD	Heptakis (2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina
E, %)	Erro relativo
EKC	Cromatografia eletrocinética (<i>Electrokinetic chromatography</i>)
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EOF	Fluxo eletrosmótico (<i>Electrosmotic flow</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FESI	<i>Stacking</i> em campo amplificado (<i>Field enhanced sample injection</i>)
FESS	<i>Stacking</i> mediado por força iônica (<i>Field enhanced sample stacking</i>)
FLV	Fluvastatina
FMN	Fator de matriz normalizado por padrão interno
γ-CD	γ -ciclodextrina
GC	Cromatografia gasosa (<i>Gas chromatography</i>)
HMG-CoA redutase	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HP-β-CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
ITP	Isotacoforese
LIQ	Limite inferior de quantificação
LLE	Extração líquido-líquido (<i>Liquid-liquid extraction</i>)
log P	Coeficiente de partição
LVSS	<i>Stacking</i> com injeção de grande volume (<i>Large volume sample stacking</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass spectrometry</i>)

MTBE	Metil-terc-butil éter
PI	Padrão interno
SLE	Extração em fase sólido-líquida (<i>Supported liquid extraction</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid phase extraction</i>)
TEC	Técnicas de eletromigração em capilares
TM-β-CD	Heptakis (2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina
UV	Ultravioleta
β-CD	β -ciclodextrina

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	v
Lista de abreviaturas.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Quiralidade de moléculas.....	2
1.2 Análise de fármacos quirais.....	3
1.3 Eletroforese capilar e técnicas de eletromigração em capilares.....	4
1.3.1 Capilares.....	7
1.3.2 Princípios da separação.....	7
1.4 Análise enantiosseletiva por cromatografia eletrocinética.....	10
1.4.1 Seletores quirais.....	11
1.4.1.1 Ciclodextrinas.....	12
1.5 Fluvastatina (FLV)	15
2. OBJETIVOS.....	22
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	24
3.1 Análise dos enantiômeros da FLV por CE.....	24
3.1.1 Equipamentos.....	24
3.1.2 Reagentes.....	24
3.1.3 Capilar.....	25
3.1.4 Solução padrão.....	25
3.1.5 Separação dos enantiômeros da FLV.....	25
3.2 Amostras de plasma.....	26
3.3 Procedimento de preparação da amostra.....	26
3.3.1 Extração líquido-líquido - <i>liquid liquid extraction</i> (LLE)	26
3.3.2 Extração em fase sólida - <i>solid phase extraction</i> (SPE)	27
3.3.3 Extração em fase sólido-líquida - <i>supported liquid extraction</i> (SLE).....	29
3.4 Determinação da ordem de migração dos enantiômeros da FLV por CE.	30
3.5 Validação do método.....	31
3.5.1 Seletividade.....	31
3.5.2 Efeito residual (<i>carry-over</i>)	32
3.5.3 Linearidade e Limite Inferior de Quantificação (LIQ).....	33
3.5.4 Precisão e exatidão.....	33
3.5.5 Integridade da diluição.....	34
3.5.6 Estudos de estabilidade dos enantiômeros da FLV em plasma.....	35
3.5.6.1 Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento.....	35
3.5.6.2 Estabilidade de curta duração.....	36
3.5.6.3 Estabilidade pós-processamento.....	36

3.5.6.4 Estabilidade de longa duração.....	36
3.6 Estudo de racemização dos enantiômeros da FLV.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Análise dos enantiômeros da FLV por CE.....	39
4.1.1 Capilar.....	39
4.1.2 Seletor quiral.....	40
4.1.3 Composição e concentração da solução de eletrólito.....	42
4.1.4 Temperatura.....	47
4.1.5 Tensão/corrente.....	48
4.1.6 Condições de separação otimizadas.....	49
4.2 Depleção do eletrólito de corrida.....	51
4.3 Ordem de migração dos enantiômeros da FLV.....	52
4.4 Procedimento de preparação da amostra.....	53
4.4.1 LLE.....	54
4.4.1.1 Avaliação do solvente.....	54
4.4.1.2 Avaliação do pH da extração.....	56
4.4.1.3 Avaliação da agitação.....	57
4.4.1.4 Avaliação do tempo de agitação.....	58
4.4.2 SPE.....	63
4.4.3 SLE.....	64
4.4.3.1 Seleção do padrão interno (PI).....	66
4.4.3.2 Concentração de amostra <i>online</i>	67
4.5 Validação do método analítico.....	71
4.5.1 Seletividade.....	71
4.5.2 Efeito residual (<i>carry-over</i>)	73
4.5.3 Linearidade e Limite Inferior de Quantificação (LIQ).....	73
4.5.4 Precisão e exatidão.....	76
4.5.5 Integridade da diluição.....	77
4.5.6 Estudos de estabilidade dos enantiômeros da FLV em plasma.....	78
4.6 Estudo de racemização dos enantiômeros da FLV.....	80
5. CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXOS.....	95
APÊNDICE.....	97

"I believe that everything happens for a reason. People change so that you can learn to let go, things go wrong so that you appreciate them when their right, you believe lies so you eventually learn to trust no one but yourself, and sometimes good things fall apart so better things can fall together"

Marilyn Monroe

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Quiralidade de moléculas

Isômeros são compostos diferentes que possuem a mesma fórmula molecular (SOLOMONS; FRYHLE, 2005; EECKHAUT; MICHOTTE, 2010). Há duas classes de isômeros: os isômeros constitucionais, os quais diferem em virtude de seus átomos estarem ligados em ordens diferentes, ou seja, possuem conectividade diferente; e os estereoisômeros, isômeros que diferem na disposição espacial dos átomos. Os estereoisômeros subdividem-se em duas categorias: os diastereoisômeros, cujas moléculas não são imagens especulares uma da outra, e os enantiômeros. Uma condição essencial para que exista enantiômero é a quiralidade. Toda molécula que não dispuser de nenhum elemento de simetria (centro, plano ou eixo) é dita assimétrica ou quiral. Assim, moléculas assimétricas possuem pelo menos um isômero, o qual apresenta semelhante fórmula molecular e tipos de ligações entre os átomos, sendo a única diferença a organização espacial dos átomos em torno do “eixo ou centro quiral”. Essas moléculas são imagens especulares uma da outra, porém não sobreponíveis e são chamadas de enantiômeros possuindo as mesmas propriedades físico-químicas, exceto o desvio da luz plano polarizada. Quando um feixe de luz plano-polarizada passa por um enantiômero, o plano de polarização gira no espaço, e em virtude do efeito dos enantiômeros separadamente provocarem o mesmo desvio angular, mas em sentidos opostos, estes podem ser ditos compostos opticamente ativos. Por outro lado, em misturas equimolares dos dois enantiômeros há o cancelamento exato de todas as rotações e essa solução é opticamente inativa, denominando-se racemato, ou mistura racêmica (SOLOMONS; FRYHLE, 2005). O fenômeno da rotação da luz plano-polarizada pelos enantiômeros foi descoberto por Louis Pasteur, que lançou as bases para o entendimento e a separação de enantiômeros (WREN, 2001). Em 1857, Pasteur também fez a primeira observação de enantiosseletividade em um processo biológico, quando ele descobriu que o (+)-ácido tartárico e seu antípoda eram metabolizados em diferentes taxas por um microrganismo (GAL, 2012). Entre o fim do século 19 e início do século 20 outros estudos foram feitos relacionados às diferenças nos efeitos biológicos dos enantiômeros, mas as primeiras provas claras foram dadas por Cushny (TESTA; MAYER, 2003), um farmacologista que demonstrou diferenças na atividade da (±)-hiosciamina e (-)-hiosciamina, e (-) e (+)-adrenalina (PATEL; HUTT, 2004).

O reconhecimento quiral e a distinção em sistemas vivos é um dos fenômenos mais intrigantes da natureza. Devido à presença de centro(s) quiral (is) ou outros tipos de assimetria na estrutura química, um grande número de compostos existe como isômeros ópticos e, frequentemente, o par de enantiômeros exibe diferentes propriedades biológicas ou farmacológicas (FANALI, 2009). Quando um fármaco quiral é administrado como racemato, os dois enantiômeros podem apresentar os processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (disposição cinética) de forma estereosseletiva (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005). Já está bem estabelecido que na maior parte dos casos a atividade farmacológica é restrita a um dos enantiômeros enquanto que o outro enantiômero pode não ter efeito, provocar efeitos adversos ou mesmo ser tóxico (HEYDEN et al., 2005; GÜBITZ; SCHMID, 2008). Isso ocorre pois os organismos vivos são constituídos de macromoléculas abundantes em centros quirais de configuração definida, como por exemplo L-aminoácidos, e os receptores e enzimas que são alvo de ação de fármacos são capazes de discriminar entre estereoisômeros (CALDWELL, 1996).

Sendo assim, o fato das formas enantioméricas poderem interagir diferentemente com sistemas biológicos tem levado ao interesse, nas últimas décadas, na síntese enantiosseletiva e análise de enantiômeros de fármacos quirais (WREN, 2001).

1.2 Análise de fármacos quirais

A análise enantiosseletiva é de grande importância na área acadêmica e industrial (SCHURIG, 2007) e a questão da quiralidade passou a ser considerada no planejamento e síntese de novos produtos farmacêuticos. As autoridades governamentais que regularizam a produção e distribuição de medicamentos, como por exemplo, o *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos - e órgãos equivalentes em demais países - enfatizam a necessidade de se ter informações sobre as propriedades físico-químicas, cinéticas e dinâmicas estereosseletivas de fármacos quirais e recomendam a produção de novos fármacos na forma de enantiômeros puros (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005; SCRIBA, 2011). À beira do terceiro milênio, o orçamento mundial para tecnologia quiral totalizou US\$ 150×10^9 por ano, com as análises quirais contabilizando 0,1%, mas ainda assim compreendendo US\$ 150×10^6 , uma enorme quantia e com crescimento anual de 15% (SCHURIG, 2007).

Diante disso, nos últimos 30 anos, têm sido observado um interesse cada vez mais acentuado pelas autoridades regulatórias farmacêuticas para a separação e quantificação dos enantiômeros (SIMÓ; GARCÍA-CAÑAS; CIFUENTES, 2010). Assim, para alcançar separações enantiosseletivas eficientes tecnologias avançadas são requeridas (PREINERSTORFER; LAMMERHOFER; LINDNER, 2009). Entretanto, pesquisas intensas nesta área somente foram possíveis a partir dos últimos 20 anos, com a emergência de novas sínteses assimétricas e poderosas técnicas de separação analíticas e preparativas. Esses avanços técnicos permitiram a produção de um gama de precursores quirais ou reagentes em escala industrial. Desde então, a quiralidade se tornou uma das maiores áreas de pesquisa para a indústria farmacêutica e as expectativas tem aumentado devido, principalmente, a razões econômicas (SCHURIG, 2007).

Assim, para se conseguir separações altamente eficientes, com reduzido tempo de análise e baixo custo, as técnicas de eletromigração em capilares (TEC) tem recebido especial atenção e são cada vez mais consideradas como importantes técnicas complementares à cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*, HPLC) (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ et al., 2010; CASLAVSKA; THORMANN, 2011).

1.3 Eletroforese capilar e técnicas de eletromigração em capilares

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração diferencial de compostos carregados em um meio semi-condutivo sob a influência de um campo elétrico. Sua origem remonta a 1880, mas, seu maior reconhecimento ocorreu em 1937, quando Arne Tiselius relatou a separação de proteínas do soro. Anos depois, em 1967, Hjerten separou compostos usando tubos de vidro de diâmetro interno de 3 mm (AHUJA, 2008). A prática atual da eletroforese capilar pode ser traçada com o trabalho pioneiro de Jorgenson e Lukacs no início dos anos 80. A eletroforese foi realizada em tubos capilares de vidro com um diâmetro interno de 75 µm e comprimento de até 1 m. Tensões de até 30 kV foram aplicadas com detecção por fluorescência (WREN, 2001).

Desde então, as TEC tem ganhado espaço e se tornado ferramenta importante para uma ampla variedade de problemas analíticos envolvendo separações (SKOOG et al., 2006). Entre suas vantagens podem-se destacar as altas resolução e eficiência, parâmetros estes de grande importância em um

processo de separação; e redução do volume de solvente e amostra necessários para efetuar uma análise, com consequente redução do custo operacional (ASSUNÇÃO et al., 2008). Os métodos cromatográficos e eletroforéticos possuem diferentes mecanismos de separação - lipofilicidade no caso da cromatografia e densidade de carga no caso da eletroforese capilar – o que torna as duas técnicas complementares uma à outra (SCRIBA, 2007). A maior contribuição que as TEC oferecem no campo da ciência da separação é a grande variedade de técnicas de separação existentes – e muitos ainda em desenvolvimento – as quais permitem a análise de praticamente todas as classes de compostos (ASSUNÇÃO et al., 2008). As principais TEC são: eletroforese capilar/eletroforese capilar em solução livre, eletroforese capilar de afinidade, eletroforese capilar de peneiramento, eletroforese capilar em gel, focalização isoeletrica capilar, isotacoforese capilar, cromatografia eletrocínica – micelar, microemulsão e eletrocromatografia capilar (SILVA et al., 2007). Dentre elas, a eletroforese capilar é a mais utilizada.

A eletroforese capilar (*capillary electrophoresis*, CE), ou eletroforese capilar em solução livre, é uma técnica de eletromigração em capilar baseada nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas (solutos), em eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos (SILVA et al., 2007).

A instrumentação consiste simplesmente de eletrodos, um capilar, uma fonte de energia, um detector e um sistema de compartimento de líquidos, conforme pode ser visto na figura 1. A injeção da amostra no capilar pode ser hidrodinâmica ou eletrocínica, sendo que a hidrodinâmica pode ser feita de três modos: por sifonamento, por aplicação de pressão no *inlet*, ou por aplicação de vácuo no *outlet* (WEINBERGER, 2000). Este tipo de injeção é útil para aplicações quantitativas ou quando eletrólitos de corrida não viscosos são usados. O intervalo de tempo nesta injeção afeta o alargamento de banda, além disso pode ocorrer variação quantitativa se o tempo de injeção for muito pequeno. Já a eletrocínica envolve o uso de tensão para injetar a amostra no interior do capilar. A amostra serve como um reservatório de eletrólito de corrida, a tensão é aplicada e o soluto migra para o capilar. Neste tipo de injeção, a quantidade de amostra injetada dependerá da mobilidade do soluto e geralmente não é adequado para aplicações quantitativas, uma vez que a variabilidade causada pela condutividade, microambientes e diferenças da matriz reduzem significativamente a reprodutibilidade (O'FLAHERTY; NUNNALLY, 2008).

Figura 1 - Esquema da instrumentação de CE.
Adaptado de Jimidar (2008)

Após a introdução da amostra, as extremidades do capilar e os eletrodos são imersos nos reservatórios que contêm a solução tampão (ou eletrólito de corrida) para completar o contato elétrico. Para minimizar os efeitos térmicos, o capilar deve ser mantido à temperatura constante (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005). O volume de injeção em CE é extremamente pequeno devido ao uso de capilares de diâmetro reduzido. Volumes de injeção típicos estão na ordem de 10 a 50 nL (JIMIDAR, 2008).

A temperatura do capilar deve ser controlada para fornecer uma eficiente remoção do calor gerado pelo efeito Joule, que por sua vez é produzido pela corrente elétrica (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993). Caso o calor gerado não seja eficientemente dissipado, há a formação de gradiente de temperatura, o que implica em convecção e gradientes de viscosidade, e finalmente num aumento da dispersão e como resultado, o alargamento do pico. Logo, o efeito Joule leva a uma perda na eficiência da separação (AHUJA, 2008). O resfriamento pode ser feito com o uso de um ventilador, ou um líquido circulante ao redor do capilar (O'FLAHERTY; NUNNALLY, 2008).

A detecção pode ser *online* (por detectores UV-DAD (*diode array detector*, DAD), espectrofotométrico, espectrofluorimétrico) ou com detectores externos (espectrometria de massas) (SUNTORNUSUK, 2010). Tipicamente, a instrumentação é controlada por um computador. O registro da aquisição de dados do detector em função do tempo é denominado eletroferograma (ALTRIA, 1996).

1.3.1 Capilares

O uso de um capilar oferece vantagem sobre outros suportes usados para eletroforese. Devido a fatores geométricos (a relação entre área superficial interna e volume é apreciavelmente grande), um capilar possibilita a dissipação eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule). Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 500 V/cm), o que resulta em alta eficiência (TAVARES, 1997).

Apesar da existência de capilares feitos de vidro borossilicato, pirex e de teflon, os capilares de sílica fundida são os mais usados. Isto ocorre devido às suas propriedades intrínsecas, como uma superior transparência para a luz ultravioleta, possuir alta condutividade térmica, baixa condutividade elétrica, alta constante dielétrica, resistência mecânica e a possibilidade de se fabricar capilares com dimensões precisas (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993).

Os capilares de sílica fundida normalmente possuem diâmetro interno de 20 a 100 μm e comprimento de 20 a 100 cm. Na separação de moléculas pequenas, capilares de sílica fundida sem recobrimento da superfície interna são comumente empregados (SILVA et al., 2007).

A sílica fundida é um polímero de dióxido de silício altamente inter cruzado, com uma altíssima força de resistência à tração, apesar de quebradiço. Recoberto externamente por uma camada de poliimida, a sílica fundida é durável, sendo que parte dessa camada é removida para criar uma janela óptica transparente de aproximadamente 0,5 cm e permitir a detecção *on capillary*, quando são usados detectores por absorção de luz (WEINBERGER, 2000).

A característica mais importante para a separação em CE é a natureza da parede interna do capilar (CHANKVETADZE, 1997). A parede interna de um capilar de sílica fundida é revestida por grupos silanóis, ionizáveis, e o desenvolvimento de uma dupla camada elétrica na interface sílica/solução leva a geração do fluxo eletrosmótico (SKOOG, 2006), o qual será discutido em maiores detalhes no item 1.3.2.

1.3.2 Princípios da separação

A aplicação de um potencial elétrico através do capilar causa movimentos eletroforéticos e eletrosmóticos. O movimento eletroforético ou mobilidade eletroforética é inerente à espécie iônica (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005). A

mobilidade do íon é influenciada em grande parte pelo seu tamanho e número de cargas iônicas (ALTRIA, 1996). A mobilidade iônica está relacionada, então, à razão carga-tamanho do íon e é dada pela equação 1:

$$\mu_e = \left(\frac{q}{6\pi} \right) \eta r \quad (1)$$

Onde μ_e representa a mobilidade eletroforética, q o número de cargas, η a viscosidade da solução e r o raio do íon (WEINBERGER, 2000). Consequentemente, um íon pequeno migrará mais rapidamente que um íon maior com o mesmo número de cargas. Similarmente, um íon com duas cargas se moverá mais rapidamente que um íon com apenas uma carga e tamanho similar (ALTRIA, 1996).

A velocidade eletroforética de um íon em solução está relacionada às suas mobilidades e à magnitude da tensão aplicada, segundo a equação 2:

$$v = \mu_e \cdot E \quad (2)$$

Onde v representa a velocidade do íon e E o campo elétrico aplicado (Volts/cm) (ALTRIA, 1996).

Um dos processos fundamentais que acompanha a eletroforese é a eletrosmose. A eletrosmose é o movimento de um líquido através de uma membrana (ou capilar) como consequência da aplicação de um campo elétrico (SILVA et al., 2007). O fluxo resultante do líquido no capilar é conhecido como fluxo eletrosmótico (*electrosmotic flow*, EOF) (JIMIDAR, 2008).

O EOF existe devido à presença de grupos silanóis ácidos na parede interna do capilar. Quando em contato com uma solução aquosa, sua superfície é hidrolisada para formar grupos silanóis. Estes grupos podem ser positivamente carregados (SiOH_2^+), neutros (SiOH) ou negativamente carregados (SiO^-) dependendo do pH da solução de eletrólitos. Em condições de pH alto (acima de 7,0), os grupos silanóis estão dissociados (SiO^-) resultando em uma superfície carregada negativamente. Cátions (contra-íons) são atraídos para a região imediatamente adjacente à superfície para balancear a carga, sendo esta camada denominada camada rígida ou fixa (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993; KAPNISSI, 2004). Devido a um movimento térmico aleatório, alguns íons se difundem, afastando-se da superfície. A concentração de contra-íons decresce com

a distância e, eventualmente, aproxima-se do valor da concentração dos íons na solução. Esta região é conhecida como camada difusa da dupla camada elétrica. Quando um potencial é aplicado à superfície, forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa, causando um movimento de íons em direção ao eletrodo de carga oposta (TAVARES, 1996; KAPNISSI, 2004): os íons de carga positiva movem-se em direção ao polo negativo (cátodo). Como esses íons estão solvatados por moléculas de água, o fluido existente no interior do capilar é mobilizado como um todo (WEINBERGER, 2000), induzindo um fluxo de solução conhecido como EOF. Porém, em condições de pH baixo (na faixa de 3,0 a 4,0), a ionização dos grupos silanóis é baixa e o fluxo eletrosmótico não é significativo (TAVARES, 1996). Portanto, o pH é, claramente, identificado como o maior parâmetro operacional que afeta a separação de espécies iônicas, já que influencia tanto o estado de carga do soluto quanto o nível de fluxo eletrosmótico (ALTRIA, 1996).

A velocidade do EOF é dada pela equação 3:

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} \cdot E \quad (3)$$

Onde v_{EOF} representa a velocidade do EOF, μ_{EOF} representa a mobilidade do EOF, e E o campo elétrico. A mobilidade do EOF pode ainda ser descrita pela equação 4:

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi \eta} \quad (4)$$

Sendo que ε representa a constante dielétrica da solução, ζ o potencial zeta, e η é a viscosidade da solução do eletrólito de corrida (ALTRIA, 1996).

A existência do EOF tem importantes implicações em CE. O EOF permite a análise simultânea de cátions, ânions e de espécies neutras em uma única corrida (TAVARES, 1996). Além disso, em sistemas dependentes de condução elétrica, o EOF é gerado uniformemente ao longo do capilar. Diferentemente de sistemas dependentes da pressão como em HPLC, onde as forças de atrito da fase móvel que interagem com as paredes da coluna resultam em gradientes de velocidade ao longo da mesma, não há variação de pressão em CE e o perfil radial de fluxo é uniforme transversalmente no capilar, exceto na proximidade da parede do mesmo,

onde o fluxo aproxima-se de zero (figura 2). A alta eficiência é uma consequência de vários fatores não relacionados (WEINBERGER, 2000), sendo um deles a diferença do perfil do fluxo entre ambas as técnicas.

Figura 2 - Comparação da CE *versus* métodos cromatográficos em fase líquida em coluna. Adaptado do site <<http://www.microsolvtech.com/cebasic.asp>>. Consulta em 10/11/2012

1.4 Análise enantiosseletiva por cromatografia eletrocinética

A resolução de enantiômeros por técnicas de eletromigração envolvem o uso de aditivos que interagem com o soluto alterando suas mobilidades eletroforéticas. Neste caso, a nomenclatura sugerida pela literatura é cromatografia eletrocinética (*electrokinetic chromatography*, EKC) em que a separação é baseada na combinação de eletroforese e interações dos solutos com aditivos, de modo a formar uma fase dispersa que se move com velocidade diferente do soluto (SILVA et al., 2007).

Devido à mesma mobilidade eletroforética dos enantiômeros (VERLEYSEN; SANDRA, 1998; CHANKVETADZE, 2009; FANALI, 2009), e idênticas constantes de dissociação (VERLEYSEN; SANDRA, 1998; FANALI, 2009) separações quirais por EKC requerem que um aditivo, ou seletor quiral, seja adicionado à solução de eletrólitos. Em decorrência de diferenças na interação dos enantiômeros com o seletor quiral, são obtidas mobilidades dependentes do tempo com a consequente separação dos enantiômeros (VERLEYSEN; SANDRA, 1998; FANALI, 2009).

Solutos com carga podem ser enantiosseparados usando seletos quirais neutros, enquanto que, para a separação de solutos neutros são necessários seletos quirais carregados (CHANKVETADZE, 2009). Assim, um importante ponto conceitual em EKC quiral é que a enantiosseparação não é baseada no princípio da separação eletroforética, ou seja, na separação como resultado das diferentes velocidades de migração causadas por diferentes densidades de carga do soluto. Os enantiômeros dos compostos quirais possuem a mesma densidade de carga, portanto nenhuma força potencial de migração, como mobilidade eletroforética do soluto ou EOF são capazes de diferenciar os enantiômeros (CHANKVETADZE; BLASCHKE, 2001). Em HPLC a separação baseia-se na distribuição do soluto entre duas fases imiscíveis, sendo que essas fases possuem mobilidades diferentes, ou seja, uma fase é móvel e a outra estacionária. Em EKC não há duas fases imiscíveis, então o que pode distinguir os enantiômeros é sua interação com o seletor quiral. O fato da EKC não possuir realmente uma fase estacionária, mas uma pseudofase estacionária, não faz muita diferença do ponto de vista mecanístico uma vez que a interação seletor-soluto será estereosseletiva e este complexo migrará devido ao EOF e à sua própria mobilidade eletroforética, ou uma combinação dos dois. Portanto, o mecanismo de enantiosseparação em EKC é cromatográfico enquanto que o mecanismo de migração é eletroforético (BLASCHKE; CHANKVETADZE, 2000; CHANKVETADZE; BLASCHKE, 2001).

1.4.1 Seletos quirais

Os seletos quirais permitem a resolução de enantiômeros através da geração de um ambiente quiral para que a separação possa ocorrer. Em ambiente aquiral, enantiômeros não podem ser separados por possuírem as mesmas propriedades físico-químicas (VERLEYSEN; SANDRA, 1998; FANALI, 2009). Logo, faz-se necessária a adição do seletor quiral à solução de eletrólito.

Se um seletor quiral interage estereosseletivamente com os enantiômeros de um soluto, há uma diferença de mobilidade entre os enantiômeros de um soluto quiral, que pode ser calculada de acordo com a equação 5:

$$\Delta\mu = \mu_R - \mu_S = \frac{\mu_f + \mu_{cR}K_R[C]}{1 + K_R[C]} - \frac{\mu_f + \mu_{cS}K_S[C]}{1 + K_S[C]} \quad (5)$$

Onde μ_R e μ_S são as mobilidades observadas dos enantiômeros R e S, respectivamente; μ_f é a mobilidade dos enantiômeros na forma não complexada; K_R e K_S são as constantes de equilíbrio de complexação dos enantiômeros R e S com o seletor quiral; μ_{cR} e μ_{cS} são as mobilidades dos complexos diastereoméricos transitórios entre o seletor quiral e os enantiômeros R e S, respectivamente; e $[C]$ representa a concentração do seletor quiral (CHANKVETADZE, 2009).

Por muitos anos, foi assumido que as mobilidades dos complexos diastereoméricos transitórios não diferiam significativamente ($\mu_{cR} = \mu_{cS}$), enquanto que as constantes de complexação dos enantiômeros R e S com o seletor quiral seriam diferentes ($K_R \neq K_S$), o que torna a equação 5 simplificada a :

$$\Delta\mu = \frac{(\mu_f - \mu_c)(K_S - K_R)[C]}{1 + (K_R + K_S)[C] + K_R K_S [C]^2} \quad (6)$$

A equação 6 implica que deve haver uma diferença na mobilidade entre o soluto livre e soluto complexado ($\mu_f - \mu_c \neq 0$), caso contrário, será impossível obter uma separação quiral (CHANKVETADZE, 2009).

Para ser efetivo, um seletor quiral deve preencher alguns requerimentos, tais como possuir estereosseletividade e formar um complexo diastereomérico transitório com cada enantiômero, deve ser solúvel e quimicamente estável no eletrólito de corrida, não deve interferir na detecção e exibir rápida cinética de complexação. Algumas substâncias como ciclodextrinas (CDs), éteres coroa, antibióticos macrocíclicos, surfactantes quirais, complexos de troca de ligante e polissacarídeos cumprem alguns desses requerimentos. Apesar de suas altas estereosseletividades, seletos quirais como proteínas, complexos de troca de ligante e antibióticos macrocíclicos são dificilmente empregados atualmente, principalmente devido à baixa estabilidade, alta absorvidade – um interferente na detecção de solutos por UV – e tendência em aderir às paredes do capilar (BLANCO; VALVERDE, 2003).

1.4.1.1 *Ciclodextrinas*

Geralmente, as CDs são os seletos quirais mais empregados nas análises enantiosseletivas, principalmente por promoverem uma boa enantiosseletividade para uma ampla gama de solutos e serem transparentes em baixos comprimentos

de onda (WREN, 2001; HEYDEN et al., 2005). As CDs são oligossacarídeos cíclicos compostos por unidades de D-glucose, unidas por ligações do tipo α (1 $\rightarrow$ 4) (SCRIBA, 2008; LOFTSSON; BREWSTER, 2010). De acordo com o número de monômeros de glicose interligados, as CDs são classificadas em α , β e γ , com 6, 7 e 8 unidades de D-glucose, respectivamente (figura 3). A conformação adotada pelas unidades de D-glicose dão às CDs a forma de um cone truncado, com as hidroxilas primárias voltadas para a parte mais estreita do cone, e as secundárias para a base mais larga do cone. Isto implica que elas possuem uma cavidade relativamente hidrofóbica enquanto as bordas da cavidade são relativamente hidrofílicas (HEYDEN et al., 2005; LOFTSSON; BREWSTER, 2010). Algumas de suas propriedades estão listadas na tabela 1 .

Figura 3 - Estrutura e tamanho das ciclodextrinas nativas (VENTURINI et al., 2008)

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas das CDs nativas

Parâmetro	Tipo de CD nativa		
	α	β	γ
Número de unidades de glucopiranosose	6	7	8
Número de grupos hidroxilas	18	21	24
Massa molecular	972	1135	1297
Diâmetro interno da cavidade (nm)	0,47–0,52	0,60–0,64	0,75–0,83
Capacidade da cavidade (nm ³)	0,176	0,346	0,510
Solubilidade em água a 25°C (g100 mL ⁻¹)	14,50	1,82	23,20

Adaptado de Maruszak et al. (2004)

Os grupamentos hidroxila nas posições 2, 3 e 6 são disponíveis para reações de derivatização. Assim, a profundidade da cavidade da CD e a solubilidade podem ser aumentadas (GUBITZ; SCHMID, 2008). Além disso, essa derivatização também aumenta a flexibilidade das CDs e todos esses fatores auxiliam na acomodação do soluto e aumentam a estabilidade do complexo resultante, ou seja, elas apresentam uma melhor capacidade de enantiodiscriminação e inclusão. Isso se reflete principalmente nas CDs derivadas neutras, como por exemplo a heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -CD, heptakis-(2,6-di-O-metil)- β -CD e hidroxipropil- β -CD (BLANCO; VALVERDE, 2003). Entre outras CDs derivadas amplamente usadas estão as carregadas negativamente, como a β -CD sulfatada, carboximetil- β -CD, e sulfobutiléter- β -CD.

As separações quirais requerem a formação de um complexo diastereomérico transitório (complexo de inclusão) entre a CD e os enantiômeros a serem separados. Este complexo transitório frequentemente é o resultado de um sítio primário de interação que domina a interação entre o enantiômero e o seletor quiral. Tal sítio de interação dominante pode ser uma complexação por inclusão, interações covalentes, ou eletrostáticas. Este complexo transitório pode exercer também outros tipos de interações secundárias de orientação, como por exemplo ligações de

hidrogênio, estéricas, ou π - π , que enfim promovem o reconhecimento quiral (STALCUP, 2006).

O tamanho da cavidade também é importante para a complexação. Apesar da inclusão não assegurar a enantiorresolução, é uma condição necessária, logo, o tamanho e a forma do soluto e do seletor quiral devem ser cuidadosamente selecionados (BLANCO; VALVERDE, 2003; FANALI; ATURKI; DESIDERIO, 1998). Entretanto, ainda não é possível prever o seletor quiral mais adequado baseado apenas nas propriedades físico-químicas e nas informações estruturais dos enantiômeros. A escolha do tipo certo de CD deve ser determinada em diferentes concentrações, vários valores de pH, e diferentes concentrações da solução tampão (NHUJAK et al., 2005). Na prática, analistas seguem a abordagem de “tentativa e erro”, em combinação com (ou sem) o uso de publicações de separações por EKC e publicações de separações por outras técnicas (RIEKKOLA et al., 1997; BLANCO; VALVERDE, 2003).

A EKC é uma escolha efetiva para a resolução de enantiômeros. As vantagens desta técnica na separação quiral são: a habilidade de mudar prontamente a natureza e a concentração do seletor quiral; o uso de vários seletos quiais combinados para aumentar a resolução quiral e o baixo consumo de amostra e de reagentes, o que permite o uso de seletos quiais de custo elevado (BLANCO; VALVERDE, 2003).

1.5 Fluvastatina (FLV)

A FLV foi descoberta em 1994, e é pertencente à segunda geração dos inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase (comumente conhecidos como estatinas) (PFFEFKORN, 2007). Foi o primeiro fármaco antilipêmico totalmente sintético desta classe (CORSINI; MAGGI; CATAPANO, 1995). Os inibidores da HMG-CoA são usados no tratamento da hipercolesterolemia, aumento excessivo dos níveis de colesterol no sangue, e estão entre os fármacos de maior sucesso comercial (ALEXANDER et al., 2009; SHAW et al., 2009), sendo esta classe considerada mais efetiva e mais bem tolerada para o tratamento da hipercolesterolemia (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007).

O colesterol é um lipídeo esteróide indispensável ao organismo, uma vez que é um componente importante das membranas celulares, é precursor na síntese de hormônios esteroides, ácidos biliares e vitamina D, participa em complexos sistemas

de sinalização intracelular (NELSON; COX, 2006; LEMKE; WILLIAMS, 2008; LOTTENBERG, 2009), e está envolvido no abastecimento e no armazenamento de energia (NELSON; COX, 2006). Dois terços do colesterol total encontrado no corpo possuem origem endógena, sendo o fígado o maior sítio de biossíntese do mesmo (HAMELIN; TURGEON, 1998; NELSON; COX, 2006; SCRIPTURE; PIEPER, 2001). A principal causa da hipercolesterolemia é o aumento do colesterol sintetizado nesse órgão (HAMELIN; TURGEON, 1998)

Como uma inibidora reversível, competitiva e altamente específica (TRUNG et. al., 2008) da enzima HMG-CoA redutase (ASLAN; SAGIRLI; ERSOY, 2009), a fluvastatina atua na via de biossíntese do colesterol em um dos passos limitantes (Figura 4): a conversão da HMG-CoA em L-mevalonato.

Figura 4 – Via de biossíntese do colesterol e atuação das estatinas (Adaptado de Menge, Hartung e Stüve, 2005).

A FLV (figura 5), (E,3R*,5S*)-7-[3-(4-fluorofenil)-1-propan-2-il-5,6-dihidroindol-2-il]-3,5-diidroxihept-6-enoato sódico, é comercializada sob a forma do sal monossódico. O fármaco em sua forma ativa, ou seja, na forma de um β -hidroxiácido (CORSINI; MAGGI; CATAPANO, 1995), confere à molécula um caráter relativamente hidrofílico quando comparada às estatinas não sintéticas. O valor do pKa da molécula é de 5,5 (SCRIPTURE; PIEPER, 2001; SCHMIDT; DZOGBETA; BOYER, 2009).

Figura 5 – Estrutura química da FLV sódica. Os asteriscos indicam os centros quirais

A FLV possui dois carbonos assimétricos na cadeia lateral do ácido heptanóico, e o fármaco é comercializado como um racemato dos estereoisômeros (+)-3R, 5S- FLV e (-)-3S, 5R- FLV (LANCHOTE et al., 2001). Porém, a atividade terapêutica é trinta vezes maior para a (+)-3R, 5S- FLV do que para a (-)-3S, 5R- FLV (KATHAWALA, 1991; KIRCHHEINER et al., 2003; BORALLI et al., 2009). O medicamento referência é o Lescol® (Novartis) e atualmente no Brasil ainda não há medicamento genérico deste fármaco, entretanto, sua patente expirou em abril de 2012 (DRUG PATENT WATCH, 2012; THE PHARMA LETTER, 2012).

Após uma dose única, a FLV é rápida e quase completamente absorvida (>90%) no trato gastrointestinal. Porém, devido ao metabolismo de primeira passagem, a FLV possui uma baixa disponibilidade e variável biodisponibilidade (19 a 29%) (DAIN et al., 1993) como resultado da extensiva eliminação pré-sistêmica e captação no fígado (JOKUBAITIS, 1996; SCRIPTURE; PIEPER, 2001), órgão que concentra a maioria da dose e é o local de ação do fármaco (SCRIPTURE; PIEPER, 2001).

O citocromo P₄₅₀ é responsável pela extensiva metabolização da FLV majoritariamente a enzima CYP 2C9 (IGEL; SUDHOP; VonBERGMANN, 2001;

SCRIPTURE; PIEPER, 2001), e em menor extensão, a CYP 3A4, CYP 2C8 e CYP 2D6 (IGEL; SUDHOP; VonBERGMANN, 2001). Dain et al. (1993) reportaram que o metabólito predominante no plasma humano é a FLV ácido N-des-isopropilpropionico, entretanto, o mesmo não possui atividade farmacológica (PLOSKER; WAGSTAFF, 1996). Em menores quantidades estão presentes o ácido 4,5-pentanóico derivado da FLV, o isômero *treo*, o isômero *trans*-lactona e conjugados da 5-hidroxi-FLV e 6-hidroxi-FLV. Os metabólitos 5-hidroxi-FLV e 6-hidroxi-FLV mostraram atividade inibitória sobre a HMG-CoA redutase, com potências de 88 e 45%, respectivamente, porém, não estão presentes no plasma em quantidades significativas devido à rápida eliminação na bile (DAIN et al., 1993).

De acordo com Jokubaitis (1996) e Deslypere (1994), a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) da FLV no plasma é de, aproximadamente, 30 minutos. Na faixa de concentração de 25 a 50000 $\mu\text{g L}^{-1}$, a FLV encontra-se 98% ligada à albumina, e em menor extensão, à α 1-glicoproteína ácida (SCRIPTURE; PIEPER, 2001).

A maior parte dos trabalhos publicados até o momento utilizam HPLC como técnica para análise da FLV sendo que para a quantificação dos enantiômeros em matriz biológica foram encontrados apenas os trabalhos apresentados na tabela 2.

No que se refere à quantificação da FLV por eletroforese capilar, apenas três artigos foram publicados até o momento. Dogrukol-Ak et. al. (2001), realizaram a análise da FLV racêmica em soro e em comprimidos. Os autores realizaram o tratamento do soro por precipitação de proteínas pela adição de acetonitrila. A análise foi realizada em capilar de sílica fundida de 58 cm de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno, e como eletrólito de corrida foi utilizado uma solução de 10mmol L^{-1} de borato de sódio em pH 8. O limite de quantificação para este método foi de 1,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o qual foi usado tanto para a quantificação em soro quanto em formulação farmacêutica, com valores de recuperação em torno de 90%.

Trung et. al. (2008) desenvolveram um método com o objetivo de aplicá-lo na determinação da pureza enantiomérica. Os autores empregaram um capilar de sílica fundida, de medidas 35,5 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno. Como eletrólito de corrida, foi utilizada uma solução tampão de borato de sódio 100 mmol L^{-1} , pH 9,2 contendo 30 mg mL^{-1} (16,1 mmol L^{-1}) de HP- β -CD como seletor quiral, tensão de 10 kV e temperatura 15°C. O tempo de migração foi de 14 minutos para o (+)-3R,5S-FLV e 14,8 minutos para (-)-3S,5R-FLV. Damic e Nigovic (2010) realizaram a análise simultânea de seis estatinas (na forma de racemato) em

medicamentos por cromatografia eletrocinética micelar e detecção por UV. O tempo da corrida eletroforética foi de 8 minutos. Assim, até o momento, não há na literatura nenhum trabalho descrito para a análise dos enantiômeros da FLV em material biológico. Portanto, este é o primeiro trabalho que propõe desenvolver um método para análise enantiosseletiva deste fármaco, em matriz biológica, por EKC.

Tabela 2 - Métodos para a análise dos enantiômeros da FLV em matrizes biológicas

Matriz biológica	Técnica de extração	Técnica de separação	Deteção	Recuperação (%)	Limite de quantificação	Referência
Plasma, urina e fezes humanas	LLE	LC, GC	MS	-	-	DAIN et al., 1993
Plasma	LLE	HPLC	Fluorescência	86	0,5 nmol.L ⁻¹ (rac.),	TORESON;
					5 nmol L ⁻¹ (enant.)	ERIKSSON, 1996
Plasma	SPE	HPLC	Fluorescência	> 90	0,5 nmol.L ⁻¹ (rac),	TORESON;
					1 nmol L ⁻¹ (enant)	ERIKSSON, 1997
Plasma	SPE	HPLC	Fluorescência	> 80	0,75 ng.mL ⁻¹ (enant.)	LANCHOTE et al., 2001
Plasma	LLE	HPLC	Fluorescência	> 80	1 ng.mL ⁻¹	ROCHA; COELHO;
					(enant.)	LANCHOTE, 2002
Plasma	LLE	HPLC	MS-MS	> 90	1,5 ng.mL ⁻¹ (enant.)	DI PIETRO et al., 2006
Plasma	LLE	HPLC	MS-MS	-	-	BORALLI et al., 2009

(rac.): racemato, (enant.): concentração para cada enantiômero.

*“Um dia é preciso parar de sonhar, e de algum
modo, partir.”*

Amyr Klink

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método para análise enantiosseletiva da FLV em plasma por eletroforese capilar.

2.2 Específicos

- Avaliar as condições para análise dos enantiômeros da FLV por técnicas de eletromigração em capilares.
 - Avaliar as técnicas de preparo de amostra, LLE, SPE e SLE, para extração dos enantiômeros da FLV em plasma.
 - Validar o procedimento de preparo de amostra desenvolvido, seguindo os parâmetros nela descritos: seletividade, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, integridade da diluição, *carry-over*, efeito matriz e estabilidade.
-

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e
sim a caminhada. Caminhando e semeando,
no fim terás o que colher.”*

Cora Coralina

Gasústica e métodos

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Análise dos enantiômeros da FLV por CE

3.1.1 Equipamentos

Foi empregado o equipamento de eletroforese capilar da Beckman Coulter, modelo P/ACETM MDQ (Fullerton, EUA), termostatizado, equipado com amostrador automático também termostatizado, um analisador, um detector UV-DAD e um sistema de aquisição de dados interligado ao software 32 KaratTM versão 8.0. A água empregada para o preparo das soluções foi obtida do sistema Direct Q3, da Millipore (Bedford, EUA).

A balança analítica utilizada nos procedimentos de pesagem foi Sartorius, modelo CP225D (Goettingen, Alemanha). O pHmetro utilizado nas medições do pH das soluções tampão foi o PHS-3B, da PHTEK (Curitiba, Brasil). Para a degaseificação das soluções utilizadas em CE foi utilizado um aparelho de ultrassom da Quimis, modelo Q3350 (Diadema, Brasil). Também foi utilizado um agitador de tubos Phoenix, modelo AP-56 (Araraquara, Brasil) para a homogeneização das soluções.

3.1.2 Reagentes

Para o preparo das soluções padrão da FLV e padrão interno foi utilizado metanol grau HPLC, da J.T. Baker (Cidade do México, México). Os reagentes (grau analítico) empregados no preparo das soluções foram o tetraborato de sódio, ácido bórico, tris hidroximetil aminometano (tris base) (Mallinckrodt Baker; Phillipsburg, EUA), hidróxido de sódio, ácido fosfórico (Vetec; Rio de Janeiro, RJ), ácido clorídrico, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico, ácido acético glacial (Synth; Diadema, SP) e acetato de sódio (Merck; Darmstadt, Alemanha). Como seletores quirais foram utilizadas as seguintes CDs: β -ciclodextrina (β -CD), 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), heptakis (2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina (DM- β -CD), heptakis (2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina (TM- β -CD) e γ -ciclodextrina (γ -CD) todas obtidas da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

As soluções usadas em EKC foram filtradas em filtros Millex-HA com membranas de tamanho de poro de 0,45 μ m, da Millipore (Bedford, EUA).

3.1.3 Capilar

O capilar de sílica fundida recoberto com poliimida foi obtido da Microsolv (Eatontown, EUA). O diâmetro interno do capilar usado foi de 75 μm e comprimento efetivo de 50,0 cm. O capilar de sílica normalmente é recoberto por uma camada de poliimida para torná-lo flexível. Para que a detecção possa ser feita no capilar, é necessário remover esta camada de poliimida na região de detecção e isto foi feito queimando uma pequena região de 0,5 cm, aproximadamente 11 cm antes do final do capilar. Após a queima, a região foi limpa com o auxílio de algodão e acetona.

3.1.4 Solução padrão

O padrão do racemato de FLV sódica (massa molecular: 433,4 g mol^{-1}) foi adquirido da Enzo Life Sciences (pureza declarada $\geq 98\%$) (New York, EUA). As soluções padrão de trabalho foram preparadas em metanol, grau HPLC, nas concentrações de 100; 30; 25; 20; 18; 15; 12,5 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de uma solução estoque de 0,5 mg mL^{-1} . Os fármacos avaliados como padrão interno (PI) foram ácido acetilsalicílico, atorvastatina, cetoprofeno, diclofenaco sódico, fenilbutazona, fenobarbital, ibuprofeno, moxifloxacino, rosuvastatina, sinvastatina e varfarina (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Foram preparadas soluções, em metanol, na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções foram armazenadas à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, em frascos âmbar vedados com o auxílio de fitas de politetrafluoretileno, na ausência de luz.

3.1.5 Separação dos enantiômeros da FLV

Vinte e cinco microlitros da solução padrão de FLV, na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram transferidos para tubos cônicos âmbar e o solvente foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio. Os resíduos foram dissolvidos em 100 μL de uma solução metanol : água deionizada (1:9, v/v) e os tubos foram agitados em *mixer* durante 1 minuto. A seguir, todo volume foi transferido para o *vial* de injeção. As condições avaliadas foram a influência da composição da solução de eletrólito de corrida (composição de sais, pH, concentração, emprego de aditivos), temperatura de análise e tensão aplicada. Também foi avaliado o tipo de seletor quiral bem como sua concentração e a influência destes sobre a resolução dos enantiômeros,

eficiência dos picos e tempo de migração. Todos os experimentos foram conduzidos sob luz amarela ou protegidos da luz para evitar a fotodegradação da FLV.

3.2 Amostras de plasma

As amostras de plasma utilizadas neste projeto de pesquisa foram obtidas de voluntários doadores de sangue do Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP – USP, ofício CEP/FCFRP nº 42/2011 e número de protocolo CEP/FCFRP nº199, conforme anexo 1.

3.3 Procedimento de preparação da amostra

Previamente às etapas de preparo das amostras, o plasma foi previamente centrifugado, a 738 g, por 10 minutos, em uma centrífuga Baby Excelsa I, modelo 206 (FANEM, Guarulhos, Brasil).

3.3.1 Extração líquido-líquido - *liquid liquid extraction* (LLE)

O procedimento de preparo de amostra foi baseado inicialmente na LLE, que tem como princípio a partição do soluto entre duas fases imiscíveis: uma fase aquosa e outra orgânica. Os solventes orgânicos utilizados no procedimento de extração – todos grau HPLC – foram metil-terc-butil éter (MTBE) (J.T. Baker; Phillipsburg, EUA), diisopropil éter (Tedia; Ohio, EUA), éter etílico, tolueno e hexano (Mallinckrodt Chemicals; New Jersey, EUA).

Foram avaliados o pH da fase aquosa e os solventes orgânicos ou misturas de solventes como: MTBE: hexano (1:1; 7:3 e 3:7, v/v), MTBE: éter etílico (7:3, v/v) e MTBE: diisopropil éter (1:1; 7:3 e 3:7, v/v), além do tempo de extração e tipo de agitação: *mixer* (Phoenix, modelo AP-56, Araraquara, Brasil) e uma mesa agitadora (*shaker*) (Tecnal, modelo TE 241; Piracicaba, Brasil). Na etapa de centrifugação foi utilizada uma centrífuga refrigerada Hitachi RX series CF5RX (Tóquio, Japão).

Um volume de 25 µL de solução padrão de FLV foram adicionados a um tubo de extração, o solvente foi completamente evaporado e em seguida foi adicionado 1 mL de plasma e realizada a extração conforme procedimento descrito no fluxograma da figura 6.

Figura 6 – Procedimento de LLE para análise dos enantiômeros da FLV em amostras de plasma.

3.3.2 Extração em fase sólida - *solid phase extraction* (SPE)

Na SPE são empregadas colunas ou cartuchos de plástico, os quais geralmente possuem um sorvente à base de sílica modificada, similar às colunas de HPLC. Segundo este procedimento, a coluna deve ser previamente condicionada, ou seja, ativada. A seguir, a amostra é aplicada sob pressão atmosférica e a coluna é lavada para eliminar as impurezas retidas durante a aplicação. Após a lavagem, o

excesso de água é eliminado sob pressão reduzida e o soluto é eluído com o solvente adequado.

Para tratamento prévio do plasma, foi feita a precipitação de proteínas anterior à SPE. Para isto foi utilizada acetonitrila (J.T. Baker; Phillipsburg, EUA) e soluções de ácido perclórico 6 mol L⁻¹ (Synth; Diadema, SP) e ácido tricloroacético 2 mol L⁻¹ (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA).

As colunas avaliadas na SPE foram Bakerbond speTM octil C8, 500 mg, 6 mL (J.T.Baker, Nova Jersey, EUA), octadecil C18, 500 mg, 6 mL (Bakerbond speTM, J.T.Baker, New Jersey, EUA); Discovery[®] DSC-18 SPE, 500 mg, 6 mL (Supelco, St. Louis, EUA); Accu Bond ODS-C18, 500 mg, 6 mL (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA), StrataTM C18-E octadecil, 100 mg, 1 mL (Phenomenex, Torrance, EUA), aminopropil Spe-edTM, 100 mg, 1 mL (Applied Separations, Allentown, EUA), OASIS[®] WAX Cartridge, 100 mg, 1 mL (Waters, Milford, EUA) e OASIS[®] MAX Cartridge, 100 mg, 1 mL (Waters, Milford, EUA).

Os solventes empregados foram metanol grau HPLC (J.T. Baker, Cidade do México, México), hexano e tolueno (Mallinckrodt Chemicals; New Jersey, EUA). Quanto aos reagentes, foram utilizados dietilamina (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), ácido clorídrico (Synth, Diadema, Brasil), ácido acético glacial (Synth; Diadema, Brasil), ácido fórmico 88% (J.T. Baker, Phillipsburgh, EUA), hidróxido de amônio (Nuclear, Diadema, Brasil), metabissulfito de sódio (Quimibrás, Rio de Janeiro, Brasil), hidróxido de sódio, ácido fosfórico (Vetec; Rio de Janeiro, RJ), ácido clorídrico, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico e acetato de sódio (Merck; Darmstadt, Alemanha).

Um volume de 25 µL de solução padrão de FLV foram adicionados a um tubo, o solvente foi evaporado à secura e em seguida foi adicionado 1 mL de plasma. O tubo foi submetido à agitação em *mixer* por 1 minuto e em seguida a amostra foi aplicada na coluna de SPE.

O procedimento geral utilizado na SPE está apresentado no fluxograma da figura 7.

Figura 7 - Procedimento de SPE para análise dos enantiômeros da FLV em amostras de plasma.

3.3.3 Extração em fase sólido-líquida - *supported liquid extraction* (SLE)

Na SLE, de modo similar à SPE, são empregadas colunas ou cartuchos de plástico. Foi empregado um cartucho HyperSep SLE contendo 1 g de terra diatomácea como sorvente, sendo esse sorvente pré-tratado para estar em pH 7,0 (Thermo Scientific, Bellefonte, EUA). Vinte e cinco microlitros de solução padrão de FLV e 25 µL do PI foram adicionados a um tubo, o solvente foi evaporado à securo e em seguida foi adicionado 0,5 mL de plasma. Igual volume de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 foi adicionado ao plasma fortificado e essa mistura foi homogeneizada em *mixer* por 1 minuto. A mistura foi aplicada na coluna e após um período de 15 minutos, 4 mL do solvente extrator foram aplicados na coluna em volumes fracionados de 1 mL para eluir o soluto. O solvente foi coletado em tubos cônicos âmbar e o solvente evaporado sob fluxo de gás nitrogênio.

O procedimento geral utilizado na SLE é mostrado no fluxograma da figura 8.

Figura 8 - Procedimento de SLE para análise dos enantiômeros da FLV em amostras de plasma.

3.4 Determinação da ordem de migração dos enantiômeros da FLV por CE

A determinação da ordem de migração dos enantiômeros da FLV foi baseada no método descrito por Lanchote et al. (2001). As análises foram realizadas em um sistema de HPLC da Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por uma bomba modelo

LC-10AS, um controlador modelo SCL 10A VP, e um detector UV/Visível SPD 10A. Para a separação, foi empregada uma coluna analítica Chiralcel OD-H - 150 mm x 4,6 mm, partículas de 5 μm (Daicel Chemical Industries LTD., Tóquio, Japão) - e fase móvel composta por hexano:etanol (J.T. Baker; Phillipsburg, EUA) (9:1, v/v) e ácido trifluoroacético 0,2% (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), na vazão de 1,0 mL min⁻¹. Nestas condições, 50 μL do padrão de FLV (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em metanol) foram transferidos para tubos cônicos e o solvente evaporado até a secura, os resíduos foram ressuspensos em 50 μL da fase móvel, sendo que 20 μL foram cromatografados. A detecção foi feita por UV, no comprimento de onda de 239 nm. Os picos correspondentes aos enantiômeros foram coletados separadamente em tubos cônicos âmbar e o solvente foi evaporado até a secura e analisado nas condições em que foi otimizada a separação dos enantiômeros da FLV por CE.

3.5 Validação do método

A validação do método bioanalítico seguiu as recomendações contidas na resolução RDC n° 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA, e as diretrizes para validação de métodos bioanalíticos (*Guidelines on bioanalytical method validation*), de 21 de julho de 2011, da *European Medicines Agency* (EMA), contemplando os parâmetros: seletividade, efeito residual, limite inferior de quantificação (LIQ), curva de calibração (linearidade), precisão, exatidão, efeito matriz, integridade da diluição e estabilidade. Os resultados obtidos foram compilados com o auxílio do *software* Microsoft Excel® 2010 versão 14.0.6129.5000.

O objetivo principal da validação do método é demonstrar sua confiança para a determinação da concentração de um soluto em uma matriz biológica específica, tais como sangue, soro, plasma, urina, ou saliva (EMA, 2011). O procedimento de extração que foi objeto da validação desenvolvida nesta dissertação foi a SLE.

3.5.1 Seletividade

A seletividade confrontou a capacidade do método analítico em diferenciar tanto os enantiômeros da FLV quanto o PI, de outros componentes endógenos da matriz biológica, ou de outros componentes presentes na amostra, tais como medicamentos eventualmente co-administrados durante a terapia medicamentosa. Para tanto, diferentes fármacos, na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol, foram

transferidos para tubos cônicos âmbar, onde 25 µL de um padrão de FLV na concentração de 20 µg mL⁻¹ em metanol foram adicionados, assim como o PI, e evaporados sob fluxo de gás nitrogênio. O resíduo foi ressuspensão em 100 µL de solução metanol:água (1:9, v/v), e injetados no CE. Os tempos de migração foram comparados com os tempos de migração dos enantiômeros da FLV e do PI e, em caso de coincidência ou proximidade dos tempos da FLV e PI em relação ao fármaco em estudo, os fármacos avaliados eram então submetidos ao procedimento de extração descrito na figura 8 e novamente realizada a análise eletroforética.

Também foi avaliado o efeito da matriz biológica e eventuais componentes endógenos do plasma na resposta do analito ou PI. Para isto foram usadas seis amostras de diferentes plasmas, sendo quatro amostras de plasma normais, duas amostras de plasma lipêmico e outras duas amostras de plasma hemolisado. Para cada uma delas foi calculado o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a fórmula a seguir:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}} \quad (7)$$

3.5.2 Efeito residual (*carry-over*)

O efeito residual consiste no efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do soluto ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente (ANVISA, 2012).

Para avaliação deste parâmetro, 0,5 mL de plasma branco (plasma isento de FLV ou do PI) foi fortificado com 25 µL da solução padrão de FLV, de modo a obter uma amostra na concentração plasmática de 725 ng mL⁻¹, e 25 µL do PI na concentração plasmática de 2500 ng mL⁻¹. A amostra foi agitada em *mixer* por um minuto para então ser submetida ao procedimento de extração conforme a figura 8. Outra amostra de plasma branco foi extraída segundo o mesmo protocolo. O equipamento foi programado de modo que a amostra de plasma branco fosse a primeira a ser injetada, seguida da injeção da amostra fortificada e extraída, e de outras duas injeções consecutivas da amostra de plasma branco extraída.

3.5.3 Linearidade e Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

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

Para avaliar a linearidade do método analítico, 0,5 mL de plasma foi fortificado com 25 μL de solução padrão de PI na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 25 μL da solução padrão da FLV nas concentrações de 5; 6,25; 7,5; 9; 10; 12,5 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada enantiômero, o que corresponde às concentrações plasmáticas de 2500 ng mL^{-1} e 250; 312,5; 375; 450; 500; 625 e 725 ng mL^{-1} de cada enantiômero, para PI e FLV, respectivamente. Após agitação em *mixer* por um minuto, as amostras foram submetidas à SLE, conforme fluxograma da figura 8. A linearidade foi realizada em triplicata.

O gráfico de calibração foi construído plotando-se no eixo das abcissas os valores de concentração plasmática de cada um dos enantiômeros da FLV e no eixo das ordenadas, a razão entre a área dos picos obtidos para os enantiômeros da FLV e a área do PI. Foi feita a avaliação estatística dos dados através de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Foram obtidas a equação da reta (inclinação da linha de regressão e o intercepto com o eixo das ordenadas), para ambos enantiômeros e realizada avaliação dos resíduos e o teste de ANOVA *lack of fit*, com o cálculo dos valores de F e *p* também para ambos enantiômeros.

3.5.4 Precisão e exatidão

A precisão do método analítico descreve a proximidade de medidas individuais repetidas do soluto, enquanto que a exatidão descreve a proximidade de um determinado valor obtido pelo método em relação à concentração nominal do soluto (EMEA, 2011).

A avaliação da precisão e exatidão intra-dia (no mesmo dia) e inter-dia (em 3 dias diferentes) foi realizada em 3 níveis de concentrações plasmáticas: 375; 500 e 625 ng mL^{-1} . As amostras correspondentes a esses níveis foram obtidas pela fortificação de 0,5 mL de plasma branco com 25 μL das respectivas soluções padrão dos enantiômeros da FLV e 25 μL do PI, sendo então agitadas em *mixer* por um minuto e em seguida submetidas ao procedimento de extração conforme descrito na figura 8. As amostras foram feitas em quintuplicata, sendo que a concentração de

250 ng mL⁻¹ referente ao limite inferior de quantificação também foi submetida aos ensaios. Os cálculos das concentrações analisadas nos ensaios de precisão e exatidão foram obtidos baseados em uma curva de calibração, em triplicata, na faixa de concentração plasmática de 250 a 625 ng mL⁻¹, para cada enantiômero da FLV, realizada todos os dias.

A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV, %), que foi calculado pela seguinte equação (7):

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (7)$$

Onde S representa a estimativa do desvio padrão, e $\bar{X}$ representa a média dos valores obtidos.

A exatidão foi expressa pelo erro relativo (E, %) e calculada pela equação 8:

$$E = \left(\frac{\text{concentração real} - \text{concentração teórica}}{\text{concentração teórica}} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

3.5.5 Integridade da diluição

A diluição de amostras não deve afetar a precisão e a exatidão. Se aplicável, a integridade da diluição deve ser demonstrada pela fortificação da matriz com o soluto em uma concentração acima do limite superior de quantificação e diluindo essa amostra com um plasma branco (EMEA, 2011). Assim, foi preparada uma amostra de plasma, fortificada com uma solução padrão dos enantiômeros da FLV, de modo que a concentração plasmática da solução fosse de 1000 ng mL⁻¹ de cada enantiômero. Essa amostra foi diluída volumetricamente, com o balão volumétrico completado com plasma branco previamente centrifugado, com cada diluição feita em quintuplicata e de modo que as amostras diluídas estivessem em concentração plasmática dentro da faixa linear do método. Após este procedimento, 0,5 mL de cada uma das replicatas diluídas foram fortificadas com 25 µL do PI, submetidas à agitação em *mixer* por um minuto e então realizado o procedimento de extração descrito na figura 8. Os cálculos das concentrações analisadas para a avaliação da

precisão e exatidão dessas amostras foram obtidos baseados em uma curva de calibração, em triplicata, na faixa de concentração plasmática de 250 a 625 ng mL⁻¹, para cada enantiômero da FLV.

3.5.6 Estudos de estabilidade dos enantiômeros da FLV em plasma

A avaliação da estabilidade deve ser feita para assegurar que a etapa de preparo da amostra, sua análise, assim como as condições de armazenamento não afete a concentração do soluto (EMEA, 2011). A estabilidade foi avaliada em dois níveis de concentração plasmática: 325 e 625 ng mL⁻¹ de cada enantiômero, em triplicata. Para isto, 0,5 mL de plasma branco previamente centrifugado foi fortificado com 25 µL da solução padrão dos enantiômeros da FLV, com agitação em *mixer* por um minuto e em seguida submetidas à diferentes condições de estabilidade, descritas nos subitens a seguir. Finalizado o estudo, foram adicionados 25 µL de solução padrão do PI aos tubos, com agitação em *mixer* por um minuto, e as amostras submetidas ao procedimento de preparo de amostra conforme descrito na figura 8.

O cálculo das concentrações das amostras submetidas aos ensaios de estabilidade e também das amostras frescas foi feito a partir de curvas de calibração no intervalo de concentração plasmática de 250 a 625 ng mL⁻¹, de cada enantiômero da FLV. As concentrações calculadas das amostras submetidas aos ensaios de estabilidade foram comparadas estatisticamente com as concentrações calculadas de amostras recém-preparadas, também submetidas ao procedimento de extração, pelo teste de análise de variância *one-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Dunnet, com o auxílio do *software* GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows (San Diego, EUA) considerando valores de $p < 0,05$ para indicar diferença na significância entre os grupos.

3.5.6.1 Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras de plasma fortificadas com os enantiômeros da FLV nas concentrações de 325 e 625 ng mL⁻¹ foram congeladas e armazenadas à temperatura de -20°C e mantidas por 12 horas, sendo descongeladas à temperatura ambiente. Após o descongelamento completo, as amostras foram novamente congeladas à -20°C, por 12 horas, completando-se assim um ciclo. Foram realizados

três ciclos de congelamento e descongelamento. Após o último ciclo, foram adicionados 25 μL de PI em cada uma das amostras, os tubos foram agitados em *mixer* por um minuto e então as amostras submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 8.

3.5.6.2 Estabilidade de curta duração

Este parâmetro avalia o tempo que o analito resiste à temperatura na qual normalmente está exposto sobre a bancada durante a análise. Este ensaio foi avaliado submetendo as amostras de plasma fortificadas com o padrão da FLV, nas concentrações plasmáticas de 325 e 625 ng mL^{-1} , à temperatura ambiente, por um período de 6 horas, na bancada. Após esse período, foram adicionados 25 μL de PI em cada uma das amostras, os tubos foram agitados em *mixer* por um minuto e então as amostras submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 8.

3.5.6.3 Estabilidade pós-processamento

Esta estabilidade avalia o período de tempo que a amostra é estável, desde o momento posterior ao fim do procedimento de preparo de amostra até o momento da injeção da última amostra da corrida analítica. Amostras de plasma branco foram fortificadas com solução padrão de FLV nas concentrações plasmáticas de 325 e 625 ng mL^{-1} , e também com 25 μL do PI. As amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 8, colocadas no injetor automático do equipamento de CE, mantidas por um período de 12 horas, e injetadas após esse intervalo.

3.5.6.4 Estabilidade de longa duração

Avalia a estabilidade da amostra fortificada frente ao congelamento e armazenamento a uma temperatura de -20°C durante o tempo total de estudo. Assim, amostras de plasma branco foram fortificadas com solução padrão de FLV nas concentrações plasmáticas de 325 e 625 ng mL^{-1} e armazenadas a uma temperatura de -20°C . Após um período de nove dias mantidas nessas condições, as amostras foram fortificadas com 25 μL de PI, submetidas à agitação em *mixer* por um minuto e em seguida ao procedimento de extração descrito na figura 8.

3.6 Estudo de racemização dos enantiômeros da FLV

Este estudo avalia a racemização que pode acontecer quando são realizadas análises enantiosseletivas. O termo racemização descreve o processo pelo qual um composto opticamente ativo é irreversivelmente transformado em uma mistura racêmica (REIST et al., 1995). Para a condução deste estudo, os enantiômeros da FLV foram coletados em escala semi-preparativa, usando as condições cromatográficas descritas no item 3.4. Após a coleta dos enantiômeros na saída do detector, o solvente da fase móvel foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio e o resíduo ressuspenso em 0,5 mL de metanol. Em seguida, 25 µL de cada uma das soluções contendo os enantiômeros separados foram transferidos para tubos cônicos âmbar, o solvente evaporado sob fluxo de gás nitrogênio, e em cada tubo foi adicionado 0,5 mL de plasma branco previamente centrifugado. As amostras foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra descrito na figura 8 e avaliadas quanto à ocorrência de racemização.

"Don't look where you fall, but where you slipped"

Provérbio africano

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise dos enantiômeros da FLV por CE

4.1.1 Capilar

As dimensões do capilar são parâmetros importantes na otimização de um método. O capilar é o centro de um sistema de eletroforese, e a escolha das dimensões desse capilar tem efeito em vários fatores como o tempo de migração e resolução, sensibilidade na detecção e na dissipação do calor gerado. O número de pratos cai dramaticamente de acordo com a diminuição no comprimento do capilar, pois capilares de comprimento menor possuem menor resistência elétrica e, portanto, geram correntes elétricas mais altas. Assim, com a redução da área superficial do capilar, a dissipação do calor também é reduzida (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993), prejudicando a análise. Ainda, capilares maiores resultam em tempos de migração mais longos, entretanto, acompanhado de aumento na resolução (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008). Por outro lado, a escolha do diâmetro interno também é importante. Capilares de diâmetro interno menor são mais eficazes na dissipação do calor gerado, pois a dissipação ocorre somente através das paredes do capilar. Além disso, capilares de diâmetro interno menor faz com que o caminho óptico seja reduzido (WEINBERGER, 2000). Então, deve existir um compromisso entre a escolha do diâmetro interno e do comprimento adequado de modo a não prejudicar a análise. Sendo assim, para avaliar a separação dos enantiômeros da FLV foi usado um capilar de 50 cm de comprimento efetivo (61 cm de comprimento total) e 75 μm de diâmetro interno.

O condicionamento do capilar tem um papel fundamental na manutenção da reprodutibilidade dos tempos de migração, das áreas dos picos (O'FLAHERTY; NUNNALLY, 2008) e da alta eficiência da separação (MAYER, 2001). É de grande importância a lavagem do capilar depois de cada corrida, pois faz com que o capilar retorne às condições iniciais (MAYER, 2001). A lavagem é realizada para ativar os grupos silanóis da sílica. Em métodos bioanalíticos, o condicionamento também é realizado para remover possíveis impurezas que podem adsorver nas paredes do capilar. Inicialmente, o condicionamento do capilar de sílica foi feito conforme a tabela 3.

Tabela 3 – Condicionamento do capilar para análise dos enantiômeros da FLV

Tipo de condicionamento	Lavagens	Tempo
Condicionamento inicial: Primeiro uso do capilar	Solução de NaOH 1 mol L ⁻¹	30 minutos
	Água deionizada	30 minutos
Condicionamento no início das atividades do dia	Solução de NaOH 0,1 mol L ⁻¹	15 minutos
	Água deionizada	15 minutos
Condicionamento entre corridas (pré- condicionamento)	Solução de NaOH 0,1 mol L ⁻¹	2 minutos
	Água deionizada	2 minutos
	Eletrólito de corrida	2 minutos

4.1.2 Seletor quiral

Para a criação do ambiente quiral, foram avaliados apenas seletos quirais pertencentes à classe das CDs devido tanto às desvantagens das outras classes, como por exemplo a alta absorção na região do UV, como pela disponibilidade das mesmas no laboratório. Sendo assim, foram selecionadas inicialmente as β -CD e γ -CD, uma vez que a molécula da FLV possui tamanho apropriado para inclusão na cavidade desses tipos de CDs: segundo Blanco e Valverde (2003), compostos com estrutura contendo um anel aromático duplamente funcionalizado possuem melhor capacidade de interagir com seletos da classe das β -CDs. Assim, foram avaliadas as β -CDs substituídas, HP- β -CD, DM- β -CD e TM- β -CD, todas de caráter neutro, uma vez que estas são capazes de melhorar a enantioseparação (MARUSZAK, et al., 2001). Destas CDs avaliadas, apenas a HP- β -CD proporcionou a separação dos enantiômeros da FLV, usando a solução tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 9,3 como eletrólito de corrida. Neste valor de pH, há um EOF intenso e a FLV encontra-se carregada negativamente devido ao seu valor de pKa (5,5). Como descrito por Chankvetadze (1997), o soluto e a CD devem ter ou cargas opostas, ou um deles ser neutro para que possam interagir de maneira apropriada. Isso explica o resultado obtido com a HP- β -CD, pois esta é uma CD neutra independentemente do pH do eletrólito de corrida e assim consegue interagir com o fármaco, que neste valor de pH está com carga negativa. Ainda, segundo Blanco e Valverde (2003), a

HP- β -CD é o seletor quiral que tem a melhor capacidade de enantiosseparar solutos que possuem em sua estrutura um anel aromático próximo a um centro quiral que contém um grupo hidroxila, estrutura essa que se assemelha a da FLV.

Foram avaliadas também diferentes concentrações de HP- β -CD (5, 10, 15, 20, 25 e 30 mmol L⁻¹), uma vez que a resolução de enantiômeros varia de acordo com a concentração do seletor quiral, onde existe uma concentração ótima de seletor quiral que corresponde a um valor máximo de resolução (RIEKKOLA et al., 1997, STALCUP, 2006, VESPALEC, 2010). O gráfico da figura 9 apresenta os eletroferogramas e a resolução dos enantiômeros da FLV em função das diferentes concentrações de HP- β -CD avaliadas. Pode ser observado que de 10 mmol L⁻¹ até 25 mmol L⁻¹ foi possível obter valores de resolução na faixa de 2,0 a 2,7. Assim, foi definida a concentração de 20 mmol L⁻¹ de HP- β -CD, a qual resultou no valor de resolução de 2,5.

Figura 9 – Eletroferogramas e gráfico referentes à seleção da concentração da HP- β -CD para a enantiosseparação da FLV. Condições eletroforéticas: capilar de 50,0 cm de comprimento efetivo e 75 μ m de diâmetro interno; eletrólito de corrida: solução tampão tetraborato de sódio; pH 9,3; temperatura: 15 °C; tensão: 15 kV; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi por 10 segundos; detecção: 239 nm

Também foi avaliada a γ -CD, na concentração de 15 mmol L⁻¹. Porém não foi observada separação dos enantiômeros da FLV, pois, segundo Stalcup (2010), quando o seletor quiral é muito maior do que o soluto, as diferenças nas propriedades físicas e químicas dos complexos diastereoméricos formados são pequenas tendo como consequência insignificantes diferenças nas propriedades ou nos tempos de formação e dissociação destes complexos não havendo, portanto, resolução quiral.

4.1.3 Composição e concentração da solução de eletrólito

Geralmente são empregadas soluções tampão com alta capacidade tamponante, e que tenham baixa condutividade, resultando em baixa corrente elétrica e baixa geração de calor, simultaneamente (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993; WEINBERGER, 2000). Um eletrólito onde cátions e ânions são de natureza orgânica geram corrente elétrica significativamente mais baixa do que um eletrólito composto de sais inorgânicos. Isto permite que sejam usados maiores concentrações sem geração excessiva de calor e possível distorção dos picos (STEINER; FRITZ, 2008), como ocorre com eletrólitos inorgânicos.

Para que os enantiômeros da FLV consigam migrar em direção ao detector, é necessário que as moléculas estejam carregadas, ou seja, que o pH do eletrólito de corrida esteja acima do pKa da molécula (5,5). Além disso, para diminuir a influência da eletrólise ao longo das corridas eletroforéticas, foi avaliado, quando possível, apenas soluções tampão como eletrólitos de corrida, cada uma na faixa de pH correspondente às suas maiores capacidades tamponantes. Desse modo, foram avaliadas diferentes soluções compostas por acetato de sódio (20 mmol L⁻¹, pH 6,0), fosfato de potássio (20 mmol L⁻¹, pH 7,0) e tetraborato de sódio (50 mmol L⁻¹, pH 9,0), contendo os 20 mmol L⁻¹ de HP-β-CD.

Com a solução de acetato de sódio (pH 6,0) não foi possível observar pico referente à qualquer um dos enantiômeros após 20 minutos de análise. Nestas condições há uma baixa intensidade do EOF devido ao baixo valor de pH do eletrólito de corrida e a mobilidade eletroforética do soluto encontra-se direcionada ao ânodo (local de injeção), ou seja, a intensidade do EOF não foi forte o suficiente para arrastar consigo o fármaco em direção ao detector. Portanto, nestas condições, a FLV poderia até migrar, mas esse tempo seria muito longo.

Já na solução tampão fosfato de sódio 20 mmol L⁻¹, pH 7,0; não foi possível observar separação dos enantiômeros, além da corrente elétrica gerada ter sido alta (120 µA). Entretanto, quando foi avaliada a solução de eletrólito composta por tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 9,0, foi observada a separação dos enantiômeros da FLV. Os ânions borato possuem relevante importância na separação dos enantiômeros da FLV.

De acordo com a literatura, carboidratos ou polióis possuem capacidade de formar complexos de carga negativa com ânions borato em meio alcalino (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993; STEFANSSON; NOVOTNY, 1993; FORET; KŘIVÁNKOVÁ; BOČEK, 1993; STALCUP, 2006; TRUNG et al., 2008; GÜBITZ; SCHMID, 2010). A molécula de FLV possui um radical 3,5-dihidroxihept-6-enoato que apresenta estrutura similar aos carboidratos e polióis. Sendo assim, de modo análogo, a FLV forma complexos de carga negativa com ânions borato, conforme pode ser visto na figura 10. Além disso, devido à natureza das CDs, as mesmas também possuem capacidade de formar complexos de carga negativa com ânions borato (SCHMID et al., 1997). Ainda, segundo Noroski, Mayo e Moran (1995), a complexação dos ânions borato com os grupos hidroxila vicinais de um soluto possuem papel crítico na interação estereosseletiva. Logo, pode-se assumir um mecanismo de reconhecimento quiral duplo baseado na inclusão do substituinte aromático do soluto na cavidade da CD, e a formação de um complexo borato misto entre os grupos hidroxila da CD e a porção do soluto que contém grupamentos diol vicinais (SCHMID; GUBITZ, 2011). Tadey e Purdy (1994), em seu trabalho envolvendo separação de nucleotídeos por eletroforese capilar – compostos que possuem carboidrato em suas estruturas – afirmam que há uma série de equilíbrios químicos entre os nucleotídeos, CD e ânions borato, sumarizados na figura 11.

Assim, de acordo com a estrutura química da FLV, pode-se prever também vários equilíbrios químicos entre os enantiômeros da FLV, a HP- β - CD e os ânions borato do eletrólito de corrida.

Figura 10 - Esquema da complexação entre íons borato e moléculas contendo grupamento diol (Adaptado de Soga (1995))

Figura 11 – Reações de equilíbrio químico que ocorrem entre o soluto (S), ciclodextrina (CD) e ânion borato (B^-), com a formação de complexos. Adaptado de Tadey e Purdy (1994)

Apesar dos complexos diol-borato possuírem carga negativa, eles são forçados a migrar para o cátodo devido ao EOF (SCHMID et al., 1997), uma vez que a mobilidade aparente do soluto corresponde à soma algébrica da mobilidade eletroforética do soluto e da mobilidade do EOF (CHANKVETADZE, 1997), sendo esta última bastante relevante. A complexação com íon borato induz mudanças na razão carga-raio do soluto (neste caso a FLV), sendo que o íon borato não apenas induz a formação de complexos móveis e com carga (SCHMITT-KOPPLIN et al., 1998), mas também aumenta significativamente a absorvância na região do UV, melhorando a detecção (HOFFSTETTER-KUHN et al. apud SCHMITT-KOPPLIN et al., 1998). Segundo Schmid (1997), a combinação de CDs com borato tem mostrado ser uma ferramenta muito efetiva na separação quiral de compostos contendo um grupamento diol vicinal em sua estrutura. A perda total da resolução ao substituir a solução tampão borato por outras soluções tampão na mesma faixa de pH mostra que a complexação com tais íons é crítica para a separação, além da inclusão do soluto na cavidade quiral da CD.

Uma vez selecionada a solução tetraborato de sódio como eletrólito de corrida, foram avaliadas as concentrações de 20, 50, 60 e 75 mmol L⁻¹ para otimizar a análise. Foi observado que o aumento na concentração da solução tampão ocasionou aumento no fator de migração (figura 12). Este aumento pode ser explicado pela diminuição do EOF devido ao aumento da concentração de contra-íons na superfície da sílica e, portanto, uma queda no potencial zeta (KUHN; HOFFSTETTER KUHN, 1993). Tempos de migração maiores fornecem um tempo maior para a discriminação entre o enantiômero e o seletor quiral, melhorando a

seletividade. Por outro lado, uma alteração na força iônica pode afetar tanto o EOF como as constantes de complexação e assim, influenciar a seletividade (SERVAIS; CROMMEN; FILLET, 2010). As soluções tampão nas concentrações de 60 mmol L⁻¹ e 75 mmol L⁻¹ geraram altos valores de corrente (acima de 100 µA) e, portanto, não foram selecionadas. Assim, a concentração do eletrólito de corrida escolhida como ideal foi a de 50 mmol L⁻¹.

Figura 12 - Influência da concentração do eletrólito de corrida na análise dos enantiômeros da FLV. Condições eletroforéticas: capilar de 50,0 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi por 10 segundos; detecção: 239 nm. Eletrólito de corrida: solução tampão tetraborato de sódio pH 9,3; seletor quiral: 20 mmol L⁻¹ HP-β-CD; tensão: 20 kV; temperatura: 15 °C

Selecionado como eletrólito de corrida a solução tampão tetraborato de sódio e a respectiva concentração (50 mmol L⁻¹), foi avaliado pH da solução do eletrólito de corrida (figura 13). Foram avaliados os valores de pH 8,7; 9,0; 9,3 e 9,5. O pH é importante por dois aspectos: a carga da molécula da FLV é fortemente dependente do pH, uma vez que a FLV é um ácido fraco e portanto, em meio onde o pH é maior que o pKa da molécula, ela estará majoritariamente em sua forma ionizada. O segundo aspecto é o EOF, o qual ocorre devido à ionização dos grupos silanóis existentes na parede do capilar. A intensidade do EOF aumenta de acordo com o aumento do pH da solução, até que a ionização dos grupos silanóis seja completa, em torno de pH 7 a 8 (KUHN; HOFFSTETTER KUHN, 1993). A partir daí, o potencial zeta não sofre mais mudanças e o EOF alcança o valor máximo. Portanto, considerando esses dois aspectos, o pH afeta a mobilidade do soluto, tendo influência direta nos tempos de migração e na reprodutibilidade dos mesmos, e na

resolução quiral. Na faixa de pH selecionada para o estudo (8,7 a 9,5), o fármaco encontra-se em sua forma aniônica, e o intenso EOF existente consegue fazer com que o mesmo migre em direção ao cátodo. Em separações quirais, variações de pH influenciam a seletividade e a enantioresolução, podendo provocar até mudanças na ordem de migração dos enantiômeros (SERVAIS; CROMMEN; FILLET, 2010).

Os ânions borato possuem uma química complexa, a equação de equilíbrio do borato em solução aquosa pode ser representada pela equação 7:

O aumento do pH desloca o equilíbrio para a direita, promovendo o aumento das espécies B(OH)_4^- , as quais complexam-se com a FLV, como previamente descrito. O complexo adquire carga ainda mais negativa quando comparado com a FLV isolada – há um aumento da relação carga-raio, fazendo com que esses ânions migrem mais lentamente, portanto aumentando o fator de migração. Em relação à seletividade, como há aumento dos íons B(OH)_4^- , a complexação do seletor quiral com o complexo borato-FLV é facilitada, aumentando a resolução entre os enantiômeros (figura 13). Assim, o pH de 9,5 foi o que proporcionou melhor resolução e tempo de migração adequado.

Figura 13 - Influência do pH do eletrólito de corrida na análise dos enantiômeros da FLV. Condições eletroforéticas: capilar de 50,0 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi por 10 segundos; detecção: 239 nm. Eletrólito de corrida: solução tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹; seletor quiral: 20 mmol L⁻¹ HP-β-CD; tensão: 20 kV; temperatura: 15 °C

4.1.4 Temperatura

A temperatura tem um importante papel em muitas separações. Um aumento na temperatura, por exemplo, traz impactos relativos ao soluto (estabilidade), ao eletrólito de corrida (viscosidade, condutividade, pH, formação de bolhas) e no equilíbrio químico (ionização da superfície do capilar, EOF), ou seja, a variação na temperatura afeta a precisão do tempo de migração e a área do pico do soluto (MAYER, 2001). Mais ainda, em EKC, a temperatura influencia grandemente a separação quiral: valores mais baixos de temperatura aumentam a constante de estabilidade do soluto com o seletor quiral e, conseqüentemente, a seletividade aumento devido ao aumento da diferença entre as mobilidades efetivas dos enantiômeros (VESPALEC, 2010). Além disso, a mobilidade eletroforética do soluto e a do EOF aumentam com a temperatura por causa da diminuição da viscosidade, ocasionando uma redução nos tempos de migração (WEINBERGER, 2000). Na otimização deste parâmetro, o aumento na temperatura provocou uma diminuição no fator de migração e também uma diminuição na resolução (figura 14). Assim, a temperatura de 15°C foi selecionada para a análise dos enantiômeros de FLV por manter o compromisso entre tempo de migração e resolução.

Figura 14 - Influência da temperatura na análise dos enantiômeros da FLV. Condições eletroforéticas: capilar de 50,0 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi por 10 segundos; detecção: 239 nm. Eletrólito de corrida: solução tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 9,5; seletor quiral: 20 mmol L⁻¹ HP-β-CD; tensão: 20 kV.

4.1.5 Tensão/corrente

Quanto à tensão aplicada no sistema, foram avaliados os valores de 15, 20, 22, 25 e 30 kV. A força elétrica aplicada no capilar, que por sua vez está diretamente relacionada à tensão, é considerada a força motriz por trás da migração de íons por CE. Tanto a velocidade de migração eletroforética como a velocidade do EOF são diretamente proporcionais ao campo elétrico, altos valores de campo elétrico implicarão em menores tempos de migração (WEINBERGER, 2000; WREN, 2001), mas ao mesmo tempo trarão como consequência altos valores de corrente elétrica devido à Lei de Ohm, onde a tensão é proporcional à corrente elétrica. Durante a análise por CE, a condução de corrente elétrica por uma solução eletrolítica gera calor via colisões friccionais entre íons ali presentes (WEINBERGER, 2000), logo, a energia elétrica é parcialmente convertida em calor (efeito Joule) (MAYER, 2001). Se este calor gerado não for adequadamente dissipado, ocorre a formação de gradientes de temperatura no capilar tendo impacto sobre a análise (WEINBERGER, 2000), levando a variações no tempo de migração dos analitos e uma diminuição na resolução e eficiência dos picos. Sendo assim, deve-se obter um compromisso entre baixos tempos de migração e baixos valores de corrente elétrica por estes últimos provocarem um pronunciado efeito Joule. Conforme os resultados apresentados na figura 15, foi possível considerar apenas valores de tensão de 15, 20, 22 e 25 kV, pois valores acima de 25 kV geraram correntes elétricas maiores do que 100 μ A o que prejudicou a análise, provavelmente por variações na temperatura do meio.

De acordo com figura 15, também é possível observar uma queda na resolução de acordo com o aumento da tensão. Essa queda pode ter ocorrido pois, ao mesmo tempo em que o aumento da tensão provoca uma diminuição no fator de migração, os enantiômeros passam um menor tempo interagindo com a CD no interior do capilar, e por isso a discriminação quiral diminui. Além disso, em maiores valores de tensão há a influência do efeito Joule, que pode contribuir para uma menor eficiência e resolução. A eficiência de um pico pode ser escrita pela equação 8:

$$N = \frac{\mu \cdot V}{2D} \quad (8)$$

Onde N representa a eficiência do pico (número de pratos), μ a mobilidade eletroforética do soluto, V representa a tensão aplicada ao sistema, e D o coeficiente de difusão do soluto. Assim, a eficiência é proporcional à tensão, mas, conforme descreve Weinberger (2000), altos valores de tensão proporcionam altos valores de eficiência desde que a separação proceda rapidamente, minimizando os efeitos da difusão, sendo isto válido até o ponto que a dissipação de calor seja adequada.

Para manter o compromisso entre tempo de migração, resolução, e eficiência, foi selecionada a tensão de 25 kV.

Figura 15 - Influência da tensão na análise dos enantiômeros da FLV. Condições eletroforéticas: capilar de 50,0 cm de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno; injeção hidrodinâmica: 0,5 psi por 10 segundos; detecção: 239 nm. Eletrólito de corrida: solução tampão tetraborato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 9,5; seletor quiral: HP- β -CD 20 mmol L^{-1} ; temperatura: 15 $^{\circ}\text{C}$

4.1.6 Condições de separação otimizadas

Após estudar todos os parâmetros discutidos anteriormente, a condição de análise que resultou na melhor resolução dos enantiômeros da FLV encontra-se descrita na tabela 4.

Tabela 4 – Condições analíticas após otimização das condições para separação dos enantiômeros da FLV por EKC

Parâmetro	Condição selecionada
Injeção	Hidrodinâmica, 0,5 psi por 10 segundos
Eletrólito de corrida	Solução tampão tetraborato de sódio
Concentração do eletrólito	50 mmol L ⁻¹
pH do eletrólito	9,5
Seletor quiral	HP- β -CD
Concentração do seletor quiral	20 mmol L ⁻¹
Tensão e temperatura	25 kV, 15 °C
Capilar	Sílica fundida, diâmetro interno: 75 μ m, comprimento efetivo: 50,0 cm

A figura 16 mostra o eletroferograma da resolução dos enantiômeros da FLV nas condições descritas na tabela 4.

Figura 16 - Eletroferograma referente à análise dos enantiômeros da FLV. Condições eletroforéticas : vide tabela 4 . (1) Fluxo eletrosmótico, (2) (+)-3R,5S-FLV ; (3) (-)-3S,5R-FLV; (4) padrão interno

4.2 Depleção do eletrólito de corrida

A solução de eletrólito de corrida não permanece constante ao longo das análises por CE (MAYER, 2001). Em soluções aquosas, a eletrólise da água produz prótons no ânodo e íons hidróxido no cátodo. Conforme o tempo de análise passa, a solução no reservatório do ânodo torna-se cada vez mais ácida enquanto que a solução no reservatório do cátodo torna-se cada vez mais alcalina. Esse efeito da depleção, ou eletrólise, do eletrólito de corrida gera um gradiente de pH formado ao longo do capilar e resulta em variações no tempo de migração, e na eficiência da separação (KELLY; ALTRIA; CLARK, 1997). A extensão desse fenômeno é dependente da capacidade tamponante do eletrólito de corrida, da concentração do eletrólito de corrida, força iônica, pH, volume do reservatório de eletrólito de corrida, temperatura, da corrente gerada e tempo total de corrida (MAYER, 2001).

A eletrólise da solução tampão tetraborato de sódio, pH 9,5, na concentração de 50 mmol L⁻¹ foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV, %) dos tempos de migração dos enantiômeros e do EOF, e CV (%) das resoluções obtidas entre os enantiômeros em 20 corridas eletroforéticas sucessivas. Os resultados desta avaliação estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Avaliação da eletrólise da solução tampão empregada como eletrólito de corrida

	Tempo de migração EOF (min.)	Tempo de migração (+)-3R,5S (min.)	Tempo de migração (-)-3S,5R (min.)
CV,%	0,49	0,19	0,21

Os CVs dos tempos de migração do EOF e dos enantiômeros da FLV apresentaram valores abaixo de 1%. Sendo assim, o mesmo reservatório de eletrólito de corrida foi usado por 20 corridas sucessivas para não comprometer os tempos de migração da (+)-3R,5S-FLV e (-)-3S,5R-FLV.

4.3 Ordem de migração dos enantiômeros da FLV

A determinação da ordem de migração dos enantiômeros da FLV em EKC foi realizada de acordo com o método descrito por Lanchote et al. (2001), por HPLC.

Para a separação dos enantiômeros da FLV os autores utilizaram a coluna Chiralcel OD-H de dimensões 150 mm x 4,6 mm, com partículas de 5 μm de diâmetro, e fase móvel composta por hexano:etanol (9:1, v/v) e ácido trifluoroacético 0,2% como aditivo orgânico da fase móvel, na vazão de 1,0 mL min^{-1} . Nesta condição, o primeiro enantiômero da FLV a eluir é a (-)-3S,5R-FLV, e o segundo, a (+)-3R,5S-FLV. Para reproduzir estas condições neste trabalho, a mesma coluna e composição de fase móvel foram utilizadas. Para a separação dos enantiômeros da FLV nestas condições, 25 μL da solução padrão de FLV na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram transferidos para tubos cônicos, o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido, os resíduos ressuspensos em 100 μL de fase móvel e 50 μL foram cromatografados. Após a separação, o pico correspondente ao enantiômero (-)-3S,5R-FLV foi coletado na saída do detector em um tubo cônico âmbar e o pico correspondente ao enantiômero (+)-3R,5S-FLV foi coletado em outro tubo cônico âmbar. Este procedimento de coleta foi repetido por 5 vezes para assegurar que a concentração dos picos fosse alta o suficiente para garantir a detecção em EKC. Após as coletas, o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido, e os resíduos ressuspensos numa solução de metanol:água (9:1, v/v) para posterior análise nas condições estabelecidas por EKC e estabelecer a ordem de migração.

Entretanto, após realizar as coletas, quando os enantiômeros foram analisados por EKC, não foi observado o aparecimento dos picos correspondentes aos enantiômeros. Diante disso, foram feitos ensaios para compreender o que estava acontecendo: aumentar a concentração da mistura racêmica injetada no HPLC, coleta dos enantiômeros com a lâmpada desligada, avaliação da solubilidade dos enantiômeros no eletrólito de corrida. Mas, nenhum destes procedimentos resolveu o problema. Diante disso, foi realizada uma nova revisão da literatura e foi verificado que a FLV sofre degradação em meio ácido, e também pode sofrer oxidação (TORESO; ERIKSSON, 1996; GOMEZ et al., 2009), ou seja, o fármaco poderia ter sofrido degradação ou oxidação tanto ao longo da corrida cromatográfica devido ao emprego do ácido trifluoroacético como aditivo orgânico da fase móvel, quanto pela evaporação da fase móvel sob fluxo de ar comprimido, respectivamente.

Assim, foi tentado realizar a separação dos enantiômeros da FLV por HPLC sem a adição do ácido trifluoroacético e utilizando nitrogênio para evaporar o solvente. Mas, a presença do aditivo orgânico e na porcentagem adequada é fundamental para a separação, como descrito por Ye, Lord e Stringham (2002), ou seja, em uma menor porcentagem de ácido trifluoroacético ou no caso de não adição deste componente na fase móvel, não foi obtida separação dos enantiômeros. Desta forma, foi decidido trocar o aditivo orgânico, ácido trifluoroacético, por um ácido mais fraco, para isto foi então avaliado o ácido acético como aditivo orgânico na fase móvel. Finalmente, usando o ácido acético foi possível coletar isoladamente os picos correspondentes aos enantiômeros e determinar a ordem de migração destes nas condições estabelecidas em eletroforese capilar. Entretanto, por ter sido alterado o tipo de ácido usado na fase móvel e por se ter conhecimento das complexas interações enantiosseletivas entre o fármaco e seletor quiral, foi avaliado se esta mudança no ácido poderia ocasionar uma inversão na retenção dos enantiômeros da FLV. Assim, apesar de se ter conseguido resolver o problema, foi comprado o padrão puro de um dos enantiômeros e feita a confirmação da ordem de migração por CE, para se afirmar, com certeza, a ordem estabelecida anteriormente, sendo esta: o primeiro enantiômero a migrar correspondeu a (+)-3R,5S-FLV e o segundo a (-)-3S,5R-FLV.

4.4 Procedimento de preparação da amostra

O preparo de amostra, também conhecido por tratamento da amostra, *clean-up* ou extração, é parte integral do método bioanalítico. A matriz biológica possui uma natureza bioquímica complexa e compreende numerosos componentes (KOLE et al., 2011). O pré-tratamento de amostras biológicas, que abrange as etapas de extração, pré-concentração e purificação, é requerido nas análises cromatográficas de fármacos, para eliminar interferentes (compostos endógenos ou outros fármacos administrados concomitantemente com os analitos) e aumentar a detectabilidade e seletividade analítica (QUEIROZ; LANÇAS, 2005). Assim, o preparo da amostra tem por objetivo o isolamento seletivo do soluto de interesse da matriz e a minimização ou eliminação dos componentes da matriz na amostra processada (KOLE et al., 2011). Um método de extração ideal deve ser rápido, simples, de custos reduzidos, e promover recuperações altas e reprodutíveis sem a degradação dos solutos; além

disso, não deve gerar grandes quantidades de resíduos químicos (Van HOUT et al., 2003). O uso do procedimento de extração ou purificação adequados maximiza a recuperação dos solutos e elimina efeitos negativos de impurezas (JANICKA; KOT-WASIK; NAMIESNIK, 2010).

4.4.1 LLE

A LLE é considerada a técnica de extração mais utilizada em análise de fármacos em matrizes biológicas e baseia-se na solubilidade do soluto em duas fases imiscíveis: a aquosa (plasma) e a orgânica. A reprodutibilidade, facilidade de realização e o baixo custo relativo fazem esta técnica ser a de primeira escolha (BONATO; JABOR; OLIVEIRA, 2010). Além disso, a LLE apresenta as vantagens de ser simples (na configuração mais comum usa-se um funil de separação ou tubos de centrífuga) e poder utilizar vários tipos de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade (QUEIRÓZ, COLLINS, JARDIM, 2001). Apesar destas vantagens, os inconvenientes são a alta quantidade de solventes utilizados, necessidade de alto grau de pureza dos mesmos, dificuldade de automação, baixa extração de fármacos altamente hidrofílicos, além do problema da ocorrência de emulsão (BONATO; JABOR; OLIVEIRA, 2010).

Os parâmetros que são fundamentais para a otimização da extração por LLE são o tipo de solvente orgânico bem como seu volume, pH, agitação, tempo de extração e adição de sal (*salting out*). Assim, estes parâmetros foram avaliados para otimizar as condições para extração da FLV do plasma.

4.4.1.1 Avaliação do solvente

O solvente utilizado em LLE deve possuir algumas características: ser volátil para permitir uma rápida concentração do soluto, ter polaridade adequada para que o soluto tenha tendência a ficar na fase orgânica, ser seletivo (por exemplo, solventes mais polares possuem certa miscibilidade em água e assim podem carregar consigo interferentes polares da matriz biológica), e ser menos densos do que a água para facilitar a remoção do solvente orgânico do sistema de partição (WELLS, D. 2003).

Para avaliação do solvente, foi necessária a acidificação do plasma para a molécula permanecer em seu estado não ionizado e a partição entre a fase orgânica ser eficiente. Então, foi selecionado o valor de pH 4,0 para testes iniciais por ser um valor próximo ao pKa da FLV.

Foram testados os solventes éter diisopropílico, éter etílico, hexano, MTBE, tolueno, e misturas hexano:tolueno (7:3, v/v e 3:7, v/v), MTBE:éter diisopropílico (7:3, v/v), e MTBE:hexano (3:7, v/v). Inicialmente, foram utilizados 4 mL de cada solvente para 1 mL de plasma fortificado com um padrão de FLV na concentração de $75 \mu\text{g mL}^{-1}$. Todos os tubos foram cuidadosamente vedados devido à volatilidade da maioria dos solventes descritos. A FLV foi particionada em um agitador horizontal (*shaker*), por 30 minutos. Após centrifugação, o solvente orgânico foi recolhido para tubos cônicos âmbar e o solvente evaporado sob fluxo de ar comprimido. Uma vez evaporado o solvente, o resíduo foi ressuspensão em $100 \mu\text{L}$ de uma solução metanol:água (1:9, v/v) para posterior injeção em CE. Estes ensaios foram realizados em triplicata. A figura 17 mostra um gráfico comparativo entre os solventes avaliados nas extrações. Apenas a mistura de solventes MTBE:hexano (3:7, v/v) não está apresentada no gráfico pois a utilização desta mistura formou emulsão, impedindo a avaliação dessa combinação.

Figura 17 – Recuperação dos enantiômeros da FLV obtida em função da variação do tipo de solvente orgânico empregado para extração por LLE. DPE: Éter diisopropílico (diisopropil éter)

Pode ser observado que o solvente que proporcionou maior recuperação dos enantiômeros da FLV foi o éter diisopropílico (DPE). Geralmente misturas de solventes aumentam a recuperação do soluto (WELLS, D., 2003), mas infelizmente neste caso, as misturas dos solventes avaliadas não apresentaram valores de recuperação satisfatórios.

4.4.1.2 Avaliação do pH da extração

Inicialmente, foram avaliados apenas valores de pH ácidos (3,0; 4,0 e 5,0) para a FLV permanecer na forma não ionizada e desse modo facilitar sua partição para a fase orgânica.

Para estabelecer a quantidade ideal de ácido a ser adicionada ao plasma para atingir os valores de pH ácidos, foram avaliadas diferentes quantidades de HCl 1 mol L⁻¹ (25; 50; 75; 100; 125; 150; 175 e 200 e 250 µL) no plasma. Para isto, 25 µL da solução padrão de 100 µg mL⁻¹ de FLV em metanol foram transferidos para tubos de ensaio de vidro âmbar, o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e a seguir foi adicionado 1 mL de plasma. O tubo foi agitado por 1 minuto em *mixer*, e diferentes volumes de HCl 1 mol L⁻¹ foram adicionados, o tubo foi novamente agitado, pelo mesmo período de tempo, e o pH medido com auxílio de fitas indicadoras de pH. Foi verificado que, com 175 µL da solução de HCl 1 mol L⁻¹ o plasma apresentou valor de pH 3,0; com 150 µL pH 4,0 e com 125 µL o pH chegou a 5,0. Pelo gráfico da figura 18 pode ser observado que em pH 4,0 foi possível obter a maior recuperação da FLV do plasma. Esperava-se que em pH 3,0 a recuperação fosse ainda maior, pois neste valor de pH a FLV estaria completamente não ionizada, e portanto sua tendência seria de particionar para o solvente orgânico. Entretanto, de acordo com o trabalho de Toreson e Eriksson (1996) e Gomez et al. (2009), provavelmente a partir do pH 3,0 o fármaco tenha sido parcialmente degradado, o que explica a menor recuperação obtida neste valor de pH.

Figura 18 - Recuperação dos enantiômeros da FLV obtidos em função da variação do pH na extração por LLE

4.4.1.3 Avaliação da agitação

A partição do soluto da fase aquosa para a fase orgânica é fortemente influenciada pela adequada agitação. O processo de agitação deve ser vigoroso de modo que a área de superfície para esta interação seja maximizada, e também deve ter uma duração suficiente para que ocorra a transferência de massa. A agitação é feita geralmente por 10 a 15 minutos, em um agitador tipo vórtex multi-tubos ou um *shaker*. Este passo é um componente importante da LLE (WELLS, D., 2003).

Foi avaliada a agitação em *mixer* por 1 minuto – com tempo menor por se tratar de uma agitação mais vigorosa – e em *shaker*, por 30 minutos. Pode ser observado pela figura 19 que a agitação em *shaker* foi mais eficiente que em *mixer*. Isto pode ser explicado porque nesse tipo de agitação, com maior duração de tempo, o equilíbrio químico é favorecido para a partição do soluto para o solvente orgânico, auxiliando dessa forma o processo de transferência de massa (WELLS, D., 2003).

Figura 19 – Recuperação dos enantiômeros da FLV obtidos em função do tipo de agitação usada na LLE

4.4.1.4 Avaliação do tempo de agitação

Uma vez selecionado o tipo de agitação, foi então otimizado o tempo de agitação no *shaker*. Foram feitas extrações nos tempos de 30, 45 e 60 minutos (Figura 20).

Figura 20 – Recuperação dos enantiômeros da FLV obtidos em função do tempo de extração por LLE.

A diferença entre os tempos de 30 e 45 minutos não mostrou ser significativa. Assim, considerando que a etapa de preparo de amostra é a mais trabalhosa e que demanda mais tempo, cerca de 80% do tempo total de um procedimento analítico

(HERNANDEZ-BORGES et al., 2007; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009), foi selecionado o tempo de 30 minutos como o ideal.

Portanto, após a avaliação de vários parâmetros, ficaram estabelecidas as condições apresentadas na tabela 6 para a etapa de extração dos enantiômeros da FLV.

Tabela 6 - Condições analíticas otimizadas para a extração dos enantiômeros da FLV em plasma por LLE

Parâmetro	Condição selecionada
Solvente orgânico	Diisopropil éter
pH	4,0
Tipo de homogeneizador	<i>shaker</i>
Tempo de extração	30 minutos

Após finalizada a etapa de otimização dos principais parâmetros que influenciam a extração por LLE, este procedimento foi avaliado em outra amostra de plasma e foi observado o aparecimento de um pico interferente com migração muito próxima ao tempo de migração do segundo enantiômero, tanto na amostra de plasma fortificada com a FLV como na amostra de plasma branco (sem adição do fármaco). Assim, foram feitas tentativas de eliminar este pico interferente, incluindo a mudança no condicionamento do capilar. O aumento do tempo de lavagem com a solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ para 4 minutos mostrou ser o mais adequado, mas não eficiente o suficiente para promover uma completa resolução entre o pico interferente e o enantiômero.

Em relação à extração, foi feita uma segunda partição, com hexano, no momento em que o resíduo da FLV era ressuspenso em metanol:água (1:9, v/v). Assim, no tubo contendo o resíduo de FLV proveniente da evaporação do solvente após extração, foram adicionados 130 µL de metanol:água (1:9, v/v) e 130 µL de hexano. Os tubos eram agitados por 1 minuto em *mixer*, centrifugados por 10 minutos e a fase aquosa recolhida e analisada por EKC. Este procedimento de partição é realizado quando interferentes que co-eluem/migram com o soluto conseguem particionar para o solvente orgânico juntamente com o soluto

(BONATO; LANCHOTE, 1993; WELLS, D., 2003). Entretanto, este procedimento não eliminou o pico interferente.

Outra tentativa foi realizar uma extração em meio básico (com a adição de 150 μL de uma solução de NaOH 1 mol L^{-1} e hexano como solvente orgânico) e em seguida realizar o procedimento de extração otimizado em meio ácido. Porém, este procedimento também não foi eficiente.

Alternativas para remoção de interferentes do plasma como a precipitação de proteínas anteriormente à LLE foi avaliada usando acetonitrila, metanol, ácido tricloroacético 2 mol L^{-1} ou ácido perclórico 6 mol L^{-1} como agentes precipitantes, mas todos sem sucesso.

Diante disto, as condições eletroforéticas previamente estabelecidas foram alteradas com o objetivo de obter a seletividade adequada. Assim, foram avaliadas outras soluções de eletrólitos de corrida: tris (50 mmol L^{-1} , pH 9,0), tris-borato (25 mmol L^{-1} , pH 8,6), tris-fosfato de sódio (30 mmol L^{-1} , pH 10,3), todas contendo 20 mmol L^{-1} de HP- β -CD, temperatura de 15 $^{\circ}\text{C}$, e 25 kV de tensão aplicada no modo de polaridade normal. Porém, estas alterações também não proporcionaram resultados satisfatórios.

Nesta fase de desenvolvimento do projeto, diante dos resultados insatisfatórios obtidos, um artigo científico publicado no ano de 2001, por Nakashima et al., para a análise da mistura racêmica da FLV em plasma, forneceu subsídios para uma nova tentativa na extração. Assim, baseado neste método, foi realizada a partição do analito usando éter etílico como solvente extrator em pH 7,0. Para obter um maior valor de recuperação usando este solvente, os autores realizaram duas partições usando menor volume de solvente. Com este procedimento, foi possível obter um plasma livre de interferentes. Portanto, baseado no resultado obtido, outros parâmetros da extração foram avaliados para otimização da LLE. Em relação ao pH da extração, no valor de 7,0, a FLV está ionizada e portanto, não deveria ser particionada para a fase orgânica. No entanto, ao observar a estrutura do fármaco, a presença de anéis aromáticos e cadeias alquílicas confere à FLV um caráter apolar ($\log P$ 3,83) (CHEM AXON, 2013). Isto explica a razão para a FLV ser particionada para o solvente orgânico, mesmo neste pH. Assim, valores de pH de 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0, obtidos pela adição de diferentes soluções tampão, foram avaliados, usando éter etílico como solvente extrator.

A figura 21 apresenta as porcentagens de recuperação obtidas nos diferentes valores de pH e pode ser observado que no pH 7,0 houve a maior porcentagem de recuperação, corroborando os resultados obtidos por Nakashima et al.

Figura 21 – Recuperação dos enantiômeros da FLV em função da variação do pH de extração

Uma vez definido o melhor pH para a extração, foi avaliado o volume do solvente utilizado na extração e também a realização de uma ou duas etapas de partição (tabela 7).

Tabela 7 – Recuperação dos enantiômeros da FLV em função do número de partições e do volume de solvente

Procedimento	Número de partições	Volume de solvente empregado em cada partição (mL)	Recuperação (%)	
			(+)-3R,5S-FLV	(-)-3S,5R-FLV
1	1	3	47,4	51,5
2	1	5	37,9	41,8
3	1	6	58,2	56,3
4	2	3	65,9	69,6
5	2	5	34,6	35,8

De acordo com os valores de recuperação obtidos, apresentados na tabela 7 pode-se observar que o uso de uma quantidade menor de solvente, porém,

realizando duas partições, foi mais eficiente em relação à porcentagem recuperada. Geralmente é recomendado que seja empregada uma proporção de 7:1 (v/v) entre o solvente e a matriz biológica para uma partição eficiente (WELLS, D., 2003). Ainda de acordo com Wells M. (2003), maior quantidade de soluto é extraída quando são realizadas várias partições usando volumes menores de solventes. Sendo assim, decidiu-se realizar duas partições usando 3 mL de éter etílico em cada partição.

Também foi avaliada a adição de sal, *salting out*, para aumentar a porcentagem de recuperação do fármaco. Isto acontece pela formação de esferas de hidratação por moléculas de água ao redor das moléculas de sal ali dissociadas. A formação dessas esferas de hidratação reduzem a quantidade de água disponível para dissolver moléculas do soluto, fazendo com que o soluto seja conduzido preferencialmente para o solvente orgânico (LORD; PAWLISZYN, 2000). Foram avaliadas três porcentagens de NaCl: 2,5; 5,0 e 10% (m/v).

A figura 22 apresenta os resultados desta avaliação e pode ser observado que a maior recuperação dos enantiômeros da FLV foi obtida usando 10% de NaCl, portanto, este foi o valor selecionado.

Figura 22 - Recuperação dos enantiômeros da FLV em função da quantidade de NaCl adicionada ao plasma

No entanto, durante a validação do método foram observadas variações extremamente altas em relação à recuperação dos enantiômeros da FLV em função da sua concentração. Assim, diante disso, e de inúmeras estratégias utilizadas para

realizar a LLE, todas sem sucesso, foi avaliada outra técnica de preparo de amostra, a SPE.

4.4.2 SPE

Apesar da LLE continuar a ser o procedimento de preparo de amostra preferido *off-line*, a SPE tem demonstrado ser uma alternativa poderosa, devido à sua simplicidade e economia em termos de tempo de análise e consumo de solvente (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ et al., 2012).

Um cartucho típico de SPE é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40-60 mm de tamanho de partícula, fixado no tubo através de dois filtros (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001) .

O procedimento de SPE compreende 5 etapas: *i)* ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; *ii)* condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; *iii)* introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; *iv)* limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito; *v)* eluição e coleção do analito (eluato) (QUEIROZ, COLLINS, JARDIM, 2001). Anterior ao procedimento de eluição, geralmente a coluna passa por um procedimento de secagem, que visa remover o resíduo de água presente na coluna, facilitando a secagem posterior do material eluído. A combinação do vácuo e um pequeno volume de metanol tem sido relatado como um procedimento simples e eficiente para obter um eluato seco, sem perda substancial do fármaco (CHEN et al., 1992).

Para avaliar a extração por SPE foram empregados vários tipos de colunas de extração e de diferentes fabricantes, além de combinações de solventes para limpeza e eluição dos compostos de interesse. Todos os ensaios realizados nesta etapa estão apresentados no apêndice 1.

Apesar de todos os esforços realizados para utilizar esta técnica de extração, mais uma vez os resultados obtidos foram insatisfatórios, no sentido de seletividade e porcentagem de recuperação. Assim, uma nova técnica de extração foi avaliada, a SLE.

4.4.3 SLE

A SLE é feita em cartuchos empacotados com terra diatomácea. Este material é um sedimento amorfo, de natureza silicosa, que pode ser originado a partir da parede celular rígida ou carapaças de algas. Dentre os constituintes que compõem a terra diatomácea destaca-se a sílica opalina, mas outros componentes podem estar presentes em menor proporção, tais como alumínio, ferro, cálcio, magnésio, sódio e potássio. Minerais também são encontrados, destacando-se os argilominerais, areias quartzosas, gipsita, mica, calcita, feldspato e carbonatos de cálcio e magnésio, além de impurezas como matéria orgânica. Estes minerais podem se apresentar na forma de cilindros muito pequenos e ocos que atuam como uma esponja, absorvendo grandes quantidades de líquidos (GOULART et al, 2011). A terra diatomácea empregada na confecção dos cartuchos de SLE é quimicamente inerte, possui grande área superficial e é altamente pura (MAJORS, 2012).

Para a realização deste procedimento de extração, a amostra é aplicada ao cartucho, esta se espalha pela superfície do suporte da terra diatomácea e a amostra é, então, absorvida. O analito permanece na superfície do suporte formando a interface para a extração. Quando o solvente orgânico é aplicado, os analitos são facilmente dessorvidos e o solvente coletado (GONG et al, 2012).

Segundo Biotage (2012), um fabricante de cartuchos para SLE, os métodos desenvolvidos por LLE são facilmente transferíveis para SLE, pois os solventes orgânicos empregados na LLE também podem ser utilizados nesses cartuchos, e as condições de pré-tratamento da amostra também são aplicados à SLE, reduzindo portanto o tempo do desenvolvimento do método por SLE. De acordo com os resultados previamente apresentados em relação à otimização da extração por LLE, foi feita uma adaptação desta para a SLE. Assim, a extração por SLE não empregou NaCl e foi realizada em uma única etapa, usando 4 mL de solvente extrator. A adição ao plasma de um volume de 0,5 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 foi mantido, mesmo considerando que o sorvente já vem pré-tratado nesse valor de pH. Usando esta técnica foram obtidos plasmas livres de interferentes endógenos nas concentrações analisadas.

A SLE é conhecida há tempos, mas tem sido raramente usada para substituir a LLE. A SLE oferece muitas vantagens sobre a LLE, incluindo uma extração equivalente ou mesmo mais eficiente, sem formação de emulsão por não depender

da agitação, fácil automação, menor uso de solvente orgânico, menos dispendiosa em relação às vidrarias e manipulação (MAJORS, 2012). Além disso, a SLE é um procedimento de preparo de amostra que demanda menos tempo em relação à LLE.

Em relação à SPE, a SLE emprega uma menor quantidade de passos necessários para a eluição do soluto que, por sua vez, implica em menor tempo de análise.

As condições para extração por SLE estão descritas na tabela 8, e o eletroferograma apresentado na figura 23

Tabela 8 - Condições analíticas otimizadas para a extração dos enantiômeros da FLV em plasma por SLE.

Parâmetro	Condição selecionada
Solvente orgânico	Éter etílico
pH do plasma	7
Tempo de espera	15 minutos
Volume de solvente	4 mL

Figura 23 - Eletroferograma referente à análise dos enantiômeros da FLV após extração por SLE. Em azul, amostra de plasma extraída. Em preto, amostra de plasma branco. (1) Fluxo eletrosmótico; (2) (+)-3R,5S-FLV; (3) (-)-3S,5R-FLV. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida (50,0 cm de comprimento efetivo e 75 μ m de diâmetro interno); eletrólito de corrida: solução tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹; pH 9,5; seletor quiral: 20 mmol L⁻¹ HP- β -CD; injeção hidrodinâmica (0,5 psi por 10 segundos); detecção em 300 nm; tensão de 22 kV; temperatura de 15 °C

4.4.3.1 Seleção do padrão interno (PI)

O método de padronização interna consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas do soluto, às quais se adiciona quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno (RIBANI et al., 2004). No desenvolvimento de métodos bioanalíticos, na maioria das vezes, é necessário o uso de um PI devido às perdas que podem ocorrer no processo de extração do fármaco da matriz biológica. Uma boa escolha do PI favorece a correção de erros devido à variação do volume de injeção, tensão, ou EOF, além disso, o PI ajuda a melhorar a repetibilidade da injeção (BONATO; JABOR; OLIVEIRA, 2010). Um PI adequado deve ter algumas características como, por exemplo: (i) não ser um constituinte da amostra, (ii) ser completamente resolvido de todos os solutos da amostra, (iii) migrar próximo ao soluto de interesse, (iv) ter propriedades físicas e químicas semelhantes às do soluto de interesse, (v) não ser reativo com o soluto ou a matriz, (vi) ter alto grau de pureza (WESTON; BROWN, 1997).

Na maior parte das vezes os fármacos que possuem maior probabilidade de serem usados com sucesso como PI, e por isso são os primeiros candidatos a testes, são aqueles que pertencem à mesma classe do fármaco em estudo. Entre as estatinas, foram avaliados três fármacos: atorvastatina, sinvastatina e rosuvastatina. Entretanto, possivelmente por serem estruturas muito parecidas, todos eles co-migraram com a (+)-3R,5S-FLV ou (-)-3S,5R-FLV. Foram avaliados então outros fármacos ácidos: ácido acetilsalicílico, cetoprofeno, diclofenaco sódico, fenilbutazona, fenobarbital, ibuprofeno e moxifloxacino. Dentre estes, fenilbutazona, fenobarbital e moxifloxacino foram os que apresentaram resolução em relação aos enantiômeros da FLV. Entretanto, o fenobarbital foi selecionado por apresentar maior simetria e eficiência. A figura 24 mostra o eletroferograma referente à análise dos enantiômeros da FLV e PI nas condições analíticas otimizadas.

Figura 24 - Eletroferograma referente à análise dos enantiômeros da FLV e PI. Em azul, análise em comprimento de onda de 239 nm para detecção do PI fenobarbital. Em preto, análise em comprimento de onda de 300 nm para a análise da FLV. (1) (+)-3R,5S-FLV (2) (-)-3S,5R-FLV (3) fenobarbital. Condições eletroforéticas: solução tampão tetraborato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 9,5, seletor quiral HP- β -CD 20 mmol L⁻¹. Tensão 25 kV. Temperatura 15°C

4.4.3.2 Concentração de amostra online

As técnicas de eletromigração em capilar com detecção *on column* possuem desvantagem em relação à detectabilidade. O uso de capilares de diâmetro reduzido faz com que o caminho óptico seja reduzido (WEINBERGER, 2000), pois de acordo com a lei de Lambert-Beer, a absorção de um composto dependerá de sua concentração e do caminho óptico percorrido pela luz. Além disso, o volume de injeção é pequeno (da ordem de nL), devido às dimensões do capilar (WEINBERGER, 2000). Assim, tanto o volume quanto o caminho óptico reduzidos implicam em limites de detecção que chegam ser a 50 vezes menor do que em HPLC (WEINBERGER, 2000) principalmente quando a detecção é feita por detector UV-Vis. Uma segunda dificuldade é a baixa concentração dos solutos em matrizes biológicas (da ordem de ng mL⁻¹ ou ainda menores) (BONATO; JABOR; OLIVEIRA, 2010). Assim, os métodos de pré-concentração de amostras são uma possibilidade de aumentar a sensibilidade (BREADMORE; HADDAD, 2001).

Diante disso, para que análises em matrizes biológicas possam ser realizadas por CE, técnicas de concentração *online* ou *stacking* normalmente são utilizadas.

Existem várias estratégias de *stacking*: isotacoforese (ITP), onde os solutos são separados em bandas sucessivas adjacentes de acordo com a diminuição da sua mobilidade eletroforética (MORAES et al., 2009); *stacking* mediado por força

iônica (*field enhanced sample stacking*, FESS), considerada a estratégia mais simples para pré-concentrar amostras usando a injeção hidrodinâmica onde um grande volume de amostra é preparada em solvente com condutividade elétrica menor que a do eletrólito de corrida; *stacking em campo amplificado* (*field enhanced sample injection*, FESI), similar a FESS, mas neste caso a amostra é injetada eletrocineticamente e o empilhamento ocorre na hora da injeção; *stacking* com injeção de grande volume (*large volume sample stacking*, LVSS), onde um grande volume da amostra dissolvida em solução tampão diluída é injetada no capilar, a polaridade do equipamento é invertida e volta à polaridade normal (PERLATTI; CARRILHO; AGUIAR, 2013); *sweeping*, que consiste na concentração de solutos apolares e é baseado na habilidade de partição na pseudofase estacionária em cromatografia eletrocinética micelar (BONATO; JABOR; OLIVEIRA, 2010), entre outros.

Para o desenvolvimento deste método foi selecionado o *stacking* de grande volume (*large volume sample stacking*, LVSS), onde a amostra, diluída em água ou em uma solução tampão de baixa condutividade, é injetada de modo a preencher de um terço ou até mesmo o capilar inteiro. A pré-concentração é baseada principalmente na diferença entre as velocidades eletroforéticas dos íons na amostra e a velocidade eletrosmótica do eletrólito de corrida. Depois da injeção da amostra, a polaridade reversa é aplicada, os íons são acelerados devido à baixa resistividade da solução onde a amostra foi diluída em direção ao eletrodo de carga oposta e são empilhados na interface da zona de injeção e do eletrólito de corrida. Enquanto o EOF migra em direção ao polo negativo, o excesso de solução contendo a amostra e solutos básicos e neutros são removidos. Quando a corrente elétrica atinge valor de 97 a 99% da corrente normal da separação indicando a remoção de parte da amostra do capilar, a polaridade é revertida para normal e a tensão é aplicada para dar prosseguimento à corrida eletroforética, com os solutos separados e eluídos (PERLATTI; CARRILHO; AGUIAR, 2013). Este tipo de *stacking* é ilustrado na figura 25

Figura 25 - Concentração de amostra *online* por LVSS e inversão de polaridade. (a) o *plug* de amostra, com condutividade menor que a do eletrólito de corrida, preenche até 95% do capilar. (b) polaridade reversa é aplicada para que o soluto de carga negativa se concentre na fronteira entre o *plug* de amostra e o eletrólito de corrida, a qual se move em direção ao *inlet* devido ao EOF (c) quando a corrente elétrica ideal é alcançada (97 a 99% do valor normal) a polaridade é revertida para polaridade normal. (d) os solutos são separados normalmente (Adaptado de Breadmore e Haddad (2001))

Para aplicar este tipo de técnica de concentração *on line*, foram avaliados o volume injetado, a tensão aplicada enquanto o sistema está sob polaridade reversa e o valor da corrente para a inversão da polaridade.

O tempo que a tensão é aplicada em polaridade reversa é de grande importância. Isso porque se o tempo de aplicação de tensão nessa polaridade for grande, o soluto pode ser eliminado do capilar juntamente com eventuais cátions e compostos neutros que estejam presentes. Foi escolhido um tempo de 60 segundos de injeção hidrodinâmica e em seguida a tensão foi otimizada. Considerando um valor de corrente elétrica de 75 μA alcançado nas condições normais do método, foram avaliadas tensões de -20, -22 e -25 kV por um período de 12 segundos. Os valores de tensão de -20, -22, -25 kV, apesar de resultarem em valores de corrente

elétrica menor do que 80 μA , não permitiram a separação dos enantiômeros. Assim, foi avaliado o tempo de 45 e 30 segundos de injeção da amostra. Além disso, também foi avaliada a tensão de -30 kV. Nestas condições foi possível obter a resolução dos enantiômeros da FLV com valor de corrente de 85 μA . A tabela 9 apresenta as condições de análise para os enantiômeros da FLV utilizando a técnica de concentração *online* por LVSS.

Tabela 9 – Condições otimizadas para separação dos enantiômeros da FLV usando LVSS como técnica de concentração *online*

Parâmetro	Condição selecionada
Injeção	Hidrodinâmica, 0,5 psi por 30 segundos
Eletrólito de corrida	Solução tampão tetraborato de sódio
Concentração do eletrólito	50 mmol L ⁻¹
pH do eletrólito	9,5
Seletor quiral	HP- β -CD
Concentração do seletor quiral	20 mmol L ⁻¹
Tensão de <i>stacking</i>	-30 kV por 12 segundos
Tensão e temperatura da análise	25 kV, 15°C
Capilar	Sílica fundida, diâmetro interno: 75 μm , comprimento efetivo: 50,0 cm

A eficiência do procedimento de *stacking* foi calculado com base na razão entre áreas dos picos dos enantiômeros submetidos ao *stacking*, e as áreas dos enantiômeros não submetidos ao *stacking*, em uma mesma concentração. Desta forma, obtido um fator de concentração de 3,38 para (+)-3R,5S, e de 3,27 para (-)-3S,5R-FLV, como ilustrado na figura 26.

Figura 26 - Eletroferograma referente à análise dos enantiômeros da FLV em amostras de plasma após extração por SLE e *stacking* por LVSS. Em azul, eletroferograma nas condições normais. Em preto, eletroferograma nas condições de *stacking*. Condições eletroforéticas: vide tabela 4 e 9, para as condições normais e por *stacking*, respectivamente. (1) Fluxo eletrosmótico, (2) (+)-3R,5S-FLV; (3) (-)-3S,5R-FLV

4.5 Validação do método analítico

Os cálculos para a quantificação dos enantiômeros da FLV foram feitos usando a área dos picos, pois em análises em que se usa *stacking* as alturas dos picos são menos precisas (MAYER, 2001).

4.5.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada em relação à capacidade de quantificar apenas o fármaco de interesse em detrimento de interferentes endógenos e outros medicamentos que possam estar presentes na matriz biológica. Assim, em relação aos fármacos avaliados, interferiram na análise o ácido acetilsalicílico, cetoprofeno, diclofenaco sódico, ibuprofeno, ofloxacino, e varfarina. Isto pode ser explicado pelo valor de pKa e pela lipofilicidade ($\log P > 1,0$) dos mesmos, que colaboram para que eles sejam extraídos pelo solvente utilizado no método de extração.

No que diz respeito a interferentes de origem endógena, a avaliação dos plasmas lipêmico e hemolisado mostrou que este tipo de matriz apresenta interferentes que prejudicam a análise. Como recomendação da ANVISA (2012), caso a metodologia bioanalítica não permita a análise deste tipo de matriz, um procedimento alternativo deve ser aplicado. Sendo assim, 0,5 mL de amostra de

plasma lipêmico foram previamente centrifugados e foi feita a fortificação do mesmo com 25 μL dos padrões de FLV e PI (concentrações plasmáticas de 375 e 625 ng mL^{-1} para os enantiômeros e 2500 ng mL^{-1} para o PI). As amostras foram então filtradas em filtros Millex-HA com membranas de tamanho de poro de 0,45 μm . Os filtrados foram então submetidos ao procedimento descrito na figura 8. Para o plasma hemolisado, 0,5 mL desse plasma foram previamente centrifugados e a fortificação foi feita de maneira semelhante à descrita para o plasma lipêmico. Após isto, foram adicionados 0,5 mL de acetonitrila nos tubos contendo o plasma, e os tubos foram agitados em *mixer* por 1 minuto e centrifugados a 738 g por 10 minutos para a separação das proteínas precipitadas e o sobrenadante submetido ao procedimento de extração descrito na figura 8.

Os FMNs das 8 amostras avaliadas (4 amostras de plasma normal, 2 amostras de plasma hemolisado e 2 amostras de plasma lipêmico) foram calculados conforme a equação 7, e os coeficientes de variação entre essas amostras foram calculados (tabela 10).

Tabela 10 - Valores de FMN por PI obtidos na avaliação da seletividade do método

Tipo de matriz	FMN ^a			
	375 ng mL^{-1}		625 ng mL^{-1}	
	(+)-3R,5S-FLV	(-)-3S,5R-FLV	(+)-3R,5S-FLV	(-)-3S,5R-FLV
Normal	0,92	0,90	1,00	0,99
	0,94	0,94	0,98	0,99
	0,92	0,94	0,95	0,94
	0,96	0,94	0,95	0,96
Lipêmica	0,91	0,89	0,92	0,90
	0,86	0,85	0,96	0,96
Hemolisada	0,75	0,72	0,94	0,94
	0,89	0,87	0,93	0,93
CV, %	7,47	8,30	2,75	3,41

Os valores de coeficiente de variação obtidos para os enantiômeros da FLV nas duas concentrações analisadas foram menores do que 15%, conforme preconizado pelos guias oficiais, indicando que o método é seletivo e que o pré-

tratamento de amostras com características lipêmicas ou hemolisadas foi eficiente na remoção dos interferentes.

4.5.2 Efeito residual (*carry-over*)

O *carry-over* consiste no efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do soluto ou PI causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente (ANVISA, 2012). Para avaliar este efeito, foi analisada amostra de plasma fortificada e extraída com 725 ng mL⁻¹ de FLV e 2500 ng mL⁻¹ de PI. A seguir foi analisada uma amostra de plasma branco extraído. Após as análises não foi observado efeito residual nas amostras de plasma branco, comprovando que não há efeito *carry-over*.

4.5.3 Linearidade e Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, em faixa analítica especificada (BRITO et al., 2003).

A curva analítica foi feita em 7 níveis de concentração, em triplicata, nas concentrações plasmáticas de 250; 312,5; 375; 450; 500; 625 e 725 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da FLV. Os gráficos de calibração foram construídos plotando-se no eixo das abcissas os valores de concentração plasmática de cada um dos enantiômeros da FLV e no eixo das ordenadas, a razão entre a área dos picos obtidos para os enantiômeros da FLV e a área do PI. As concentrações dos analitos são determinadas por meio de regressões obtidas a partir das curvas de calibração e normalmente se opta pela regressão linear, por sua maior simplicidade e aplicabilidade (CASSIANO et al., 2009).

O ajuste de qualquer equação matemática é feito pelo método dos mínimos quadrados, e este ajuste fornecerá os coeficientes de regressão, que no caso de um ajuste linear são os coeficientes lineares e angulares. A adequação do ajuste da curva é fornecida pelo coeficiente de correlação (*r*). No entanto, apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração. Uma curva bem ajustada deverá apresentar erros com distribuição uniforme, ausência de amostras atípicas (RIBEIRO et al., 2008), e a dispersão das medidas (valores de *y*) deve ser independente da concentração do

padrão de calibração, seguindo uma distribuição normal, propriedade conhecida como homoscedasticidade. A homoscedasticidade da regressão linear pode ser avaliada pelo teste de ajuste do modelo, pela observação do gráfico de resíduos *versus* concentração ou pela aplicação do teste F de significância, calculado pela razão entre as variâncias da menor e da maior concentração da faixa linear de concentração. Esse valor é comparado ao valor de F_{tabelado} , sendo que o valor de F calculado experimentalmente deve ser menor que o F_{tabelado} , indicando que a variância é constante em toda a faixa da curva de calibração e os resíduos estarão aleatoriamente distribuídos no eixo x, concluindo-se então que o modelo empregado é adequado (CASSIANO et al., 2009). Os dados obtidos para a curva analítica, incluindo valor de F tanto tabelado quanto o calculado, e o valor de p foram calculados com o auxílio do *software* estatístico Minitab® e estão apresentados na tabela 11, mostrando que o modelo linear de regressão aplicado a este método está bem ajustado e portanto pode ser aceito. A figura 27 mostra o gráfico da curva analítica e a distribuição dos resíduos para os enantiômero (+)-3R,5S-FLV, e a figura 28 para o enantiômero (-)-3S,5R-FLV.

O LIQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI et al., 2004). Para avaliar o LIQ foram analisadas a precisão e exatidão, em quintuplicata, de amostras de plasma fortificadas nas concentrações plasmáticas de 250 ng mL⁻¹. Através dos dados obtidos e representados na tabela 11, é possível afirmar que os valores de precisão e exatidão estão em conformidade com os preconizados pelos guias de validação bioanalítica, recomendados para serem menores que 20%.

Tabela 11 - Linearidade e LIQ do método para análise dos enantiômeros da FLV

Parâmetro	(+)-3R,5S-FLV	(-)-3S,5R-FLV
Linearidade		
Intervalo (ng mL ⁻¹)	250 a 725	250 a 725
Equação linear	y = 0,000079 x - 0,00253	y = 0,000083x - 0,00489
<i>ANOVA lack of fit</i>		
Valor F	1,39	1,22
Valor p	0,29	0,35
LIQ (ng mL⁻¹)	250	250
CV (%)	2,7	1,7
E (%)	15,2	6,5

F_{tab} (0,05) = 2,96

Figura 27 -Linearidade do método analítico para a (+)-3R,5S-FLV. (a) Gráfico da curva analítica obtida por regressão linear (b) Gráfico de resíduos

Figura 28 - Linearidade do método analítico para a (-)-3S,5R-FLV. (a) Gráfico da curva analítica obtida por regressão linear (b) Gráfico de resíduos

4.5.4 Precisão e exatidão

O termo precisão fornece a dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio. É estimada em dois níveis: precisão intra-dia, que define a precisão dos resultados obtidos dentro do próprio laboratório, por um mesmo analista e com a mesma instrumentação; a precisão inter-dia, ou precisão intermediária, define a precisão dentro de um mesmo laboratório para medidas obtidas por diferentes analistas, ou em diferentes dias, ou em equipamentos diferentes (RIBEIRO et al., 2008). Os ensaios intra-dia foram realizados em quintuplicatas de amostras de plasma fortificadas em quatro níveis de concentração plasmática (incluindo o LIQ), em um mesmo dia: 250 (LIQ); 375; 500 e 625 ng mL⁻¹. Já os ensaios inter-dia foram realizados com quintuplicatas de amostras de plasma fortificadas em quatro níveis

de concentração plasmática, anteriormente citados (incluindo o LIQ), em três dias diferentes.

Os resultados dos ensaios, apresentados na tabela 12, mostram que o método é preciso e exato para a quantificação dos enantiômeros da FLV em plasma, estando dentro do limite aceitável (CV% e E% < 15%, exceto para o LIQ – CV% e E% < 20%) de acordo com a ANVISA (2012) e EMEA (2011).

Tabela 12 - Precisão e exatidão do método para análise dos enantiômeros da FLV

Parâmetros		Enantiômeros da FLV							
		250		375		500		625	
Concentração plasmática nominal (ng mL ⁻¹)		(+)-3R,5S-FLV	(-)-3S,5R-FLV	(+)-3R,5S-FLV	(-)-3S,5R-FLV	(+)-3R,5S-FLV	(-)-3S,5R-FLV	(+)-3R,5S-FLV	(-)-3S,5R-FLV
Concentração analisada (ng mL ⁻¹)		253,83	257,91	364,93	362,06	498,15	501,76	623,20	626,67
Ensaio intra-dia (n ^a =5)	CV (%)	9,65	10,08	6,83	4,90	7,61	8,15	6,18	6,32
	E (%)	1,53	3,16	-2,68	-3,45	-0,37	0,35	-0,29	0,27
Concentração analisada (ng mL ⁻¹)		265,04	260,45	370,73	360,20	488,64	482,22	630,43	633,79
Ensaio inter-dia (n ^b =3)	CV (%)	9,13	7,92	7,14	7,01	6,56	8,80	6,87	6,83
	E (%)	6,02	4,18	-1,14	-3,95	-2,27	-3,56	0,87	1,41

n^a: número de ensaios; n^b: número de dias

4.5.5 Integridade da diluição

As amostras de plasma, em quintuplicata, nominalmente na concentração de 400 ng mL⁻¹, diluídas a partir de uma amostra de plasma fortificada na concentração 1000 ng mL⁻¹, foram extraídas e analisadas por EKC e os valores de precisão e exatidão calculados (tabela 13).

Tabela 13 - Avaliação da precisão e exatidão de amostras de plasma diluídas

Parâmetro	FLV	
Concentração plasmática nominal (ng mL ⁻¹)	400	
<i>n</i> ^a = 5	(+)-3R,5S - FLV	(-)-3S,5R - FLV
Concentração analisada (ng mL ⁻¹)	431,72	430,62
Precisão (CV, %)	3,87	3,32
Exatidão (E, %)	-13,66	-13,88

^a *n*, número de replicatas

A análise dos dados mostra que as diluições estão de acordo com os valores de precisão e exatidão definidos pelos guias de validação bioanalítica, ou seja, valores menores do que 15%, permitindo afirmar que a diluição de amostras de plasma reais que estejam em concentração maior que a definida pela faixa linear do método não afeta a precisão e exatidão.

4.5.6 Estudos de estabilidade dos enantiômeros da FLV em plasma

Para assegurar que a estabilidade do analito seja mantida nas condições de preparo, análise e estocagem das amostras, vários tipos de estabilidade devem ser avaliados durante a validação de um método analítico: estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade das amostras processadas e estabilidade de longa duração (RIBEIRO et al., 2008). Amostras recém preparadas foram comparadas à amostras submetidas a diferentes condições de estabilidade usando o teste de análise de variância, ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnet, e foram obtidos os valores de *p* dessas comparações. Valores de *p* < 0,05 indicaram diferença significativa entre as amostras recém-preparadas e àquelas submetidas à estabilidade. Os valores de *p* e CV das amostras do estudo feitas em triplicatas foram calculados e são mostrados na tabela 14.

Tabela 14 - Análise de estabilidades da (+)-3R,5S-FLV e (-)-3S,5R-FLV em plasma, em diferentes concentrações

	375 ng mL ⁻¹		625 ng mL ⁻¹	
	(+)-3R,5S-FLV	(-)-3S,5R-FLV	(+)-3R,5S-FLV	(-)-3S,5R-FLV
Valor <i>p</i>^a	0,051	0,192	0,024*	0,018*
CV, %	11,98	10,66	10,17	11,26

^a ($\alpha = 0,05$), * indica diferença significativa em relação ao grupo de amostras recém-preparadas

Pelos valores de *p* é possível inferir que as amostras de alta concentração plasmática não são estáveis pelo período de duração do estudo. Em uma análise mais cuidadosa da ANOVA e do pós-teste de Dunnet dessas amostras, verificou-se que a triplicata referente à concentração de 625 ng mL⁻¹ que apresentou a maior diferença entre as médias do grupo submetido à estabilidade e a das triplicatas das amostras recém-preparadas era a de longa duração, que pode ser visto na figura 29. Dentro desse grupo de triplicatas, apenas uma delas possuía um valor mais baixo de concentração em relação à média das triplicatas. Essa observação permite concluir que um erro analítico pode ter ocorrido durante a análise dessa amostra e que é muito provável que os enantiômeros sejam estáveis no período de nove dias. Como os outros valores de *p* são maiores que 0,05 e o CV das amostras é menor que 15%, pode-se afirmar que os enantiômeros da FLV são estáveis nas condições de estabilidade de congelamento e descongelamento, curta duração e pós-processamento.

Figura 29 - Avaliação da variação da concentração plasmática das amostras dos grupos submetidos ao estudo de estabilidade em relação ao grupo controle (amostras recém-preparadas)

4.6 Estudo de racemização dos enantiômeros da FLV

Amostras de plasma fortificadas com os enantiômeros (+)-3R,5S-FLV e (-)-3S,5R-FLV coletados isoladamente e submetidas ao procedimento de extração foram analisados por EKC. Após análise dos eletroferogramas de cada amostra extraída foi possível observar que não houve racemização de nenhum dos enantiômeros, uma vez que não foram detectados outros picos que não aqueles correspondentes a cada enantiômero isoladamente.

"Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer"

Amyr Klink

Conclusão

5. CONCLUSÃO

A FLV é um fármaco antilipêmico, utilizada no tratamento de hipercolesterolemia, comercializada como mistura racêmica dos estereoisômeros (+)-3R,5S-FLV e (-)-3S,5R-FLV, sendo que a atividade terapêutica é trinta vezes maior para a (+)-3R,5S-FLV do que para seu antípoda. Devido a esta diferença na atividade terapêutica, a análise enantiosseletiva da FLV é importante para estudos de farmacologia clínica. Assim, foi desenvolvido um método bioanalítico, eficiente e rápido, para análise dos enantiômeros da FLV em plasma, por cromatografia eletrocinética utilizando a HP- β -CD como seletor quiral. A enantioseparação foi obtida em 7 minutos com fator de resolução de 2,6. O procedimento de preparo da amostra utilizado foi a SLE, uma técnica de extração que utiliza cartuchos empacotados com terra diatomácea. Esta nova técnica apresentou resultados satisfatórios em relação à seletividade quando comparada à LLE e SPE, além da rapidez no preparo da amostra. As características de desempenho analítico avaliadas estão de acordo com os guias oficiais garantindo a confiabilidade do método. Além disso, foi avaliada a LVSS, uma técnica eletroforética de concentração *online*, na qual foi obtido um fator de concentração de 3,2, o que possibilitou obter menor limite de quantificação. Assim, este é o primeiro método enantiosseletivo desenvolvido para análise da FLV por cromatografia eletrocinética e que pode ser aplicado em amostras de plasma de pacientes que fazem uso deste fármaco.

Referências

REFERÊNCIAS

- AHUJA, S. Overview of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. In: AHUJA, S.; JIMIDAR, M.I. (Ed.) **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**. London: Academic Press, 2008. p.1-8.
- ALEXANDER, K. P.; BLAZING, M. A.; ROSENSON, R. S.; HAZARD, E.; ARONOW, W. S.; SMITH, S. C. Jr; OHMAN, E. M. Management of hyperlipidemia in older adults. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**. Naperville, v. 14, p. 49-58, 2009.
- ALTRIA, K.D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, operation and applications**. New Jersey: Humana Press.1996. 349 p.
- ASLAN, S. S.; SAGIRLI, O.; ERSOY, L. Development and validation of a GC-FID assay for determination of fluvastatin in pharmaceutical preparations. **Química Nova**. São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2347-2350, 2009.
- ASSUNÇÃO, N.A.; BECHARA, E.J.H.; SMIONATO, A.V.C.; TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS): vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**. São Paulo, v. 31, n. 8, p. 2124-2133, 2008.
- BLANCO, M.; VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 7 e 8, 2003.
- BLASCHKE, G.; CHANKVETADZE, B. Enantiomer separation of drugs by capillary electromigration techniques. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 875, n. 1-2, p. 3-25, 2000.
- BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.; GAITANI, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**. São Paulo, v. 28, n. 4, p.683-691, 2005.
- BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.; OLIVEIRA, A.R.M. Analysis of Chiral Drugs in Body Fluids. In: ECKHAUT, A.V.; MICHOTTE, Y. **Chiral Separations by Capillary Electrophoresis**. Boca Raton: CRC Press, 2010, 341-359p.
- BONATO, P. S.; LANCHOTE, V. L. A rapid procedure for the purification of biological samples to be analyzed by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. London, v.16, n.11, 1993.
- BORALLI, V. B.; COELHO, E. B.; CERQUEIRA, P. M.; LANCHOTE, V. L. Stereoselective analysis of metoprolol and its metabolites in rat plasma with application to oxidative metabolism. **Journal of Chromatography B**. Amsterdam, v. 823, n. 2, p. 195-202, 2005.
- BORALLI, V.B.; COELHO, E.B.; SAMPAIO, S.A.; MARQUES, M.P.; LANCHOTE, V.L. Enantioselectivity in the Pharmacokinetic Interaction Between Fluvastatin and Lercanidipine in Healthy Volunteers. **Journal of Clinical Pharmacology**. Stamford, v.49, n.2, p.205-211, 2009.

- BREADMORE, M.C.; HADDAD, P.R. Approaches to enhancing the sensitivity of capillary electrophoresis methods for the determination of inorganic and small organic anions. **Electrophoresis**. Weinheim, n. 22, p. 2464–2489, 2001.
- BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2007. 11. ed. 1821p.
- CALDWELL, J. Importance of stereospecific bioanalytical monitoring in drug development. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam n.719, p. 3-13, 1996.
- 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**, Amsterdam v. 1218, n. 4, p.588-601, 2011.
- CHANKVETADZE, B. **Capillary electrophoresis in chiral analysis**. England: John Wiley and Sons, 1997, 555 p.
- CHANKVETADZE, B. Separation of enantiomers with charged chiral selectors in CE. **Electrophoresis**. Weinheim, v. 30, n.1, p. S211-S221, 2009.
- CHANKVETADZE, B; BLASCHKE, G. Enantioseparations using capillary electromigration techniques in nonaqueous buffer. **Electrophoresis**. Weinheim v. 21, n. 18, p. 4159-4178, 2001.
- CHEN, X.H.; FRANKE, J.P.; DE ZEEUW, R.A. Solid-phase extraction for systematic toxicological analysis. **Forensic Science Reviews**.Taiwan, v.4, p.147, 1992.
- CORSINI, A.; MAGGI, F.M.; CATAPANO, A.L. Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. **Pharmacology Research**. London, v.31, n.1,1995.
- DAIN, J.G.; FU, E.; GORSKI, J.; NICOLETTI, J.; SCALLEN, T.J. Biotransformation of fluvastatin sodium in humans. **Drug Metabolism and Disposition**. Bethesda. v.21, n.4, p.567-572, 1993.
- DAMIC, M.; NIGOVIC, B. Fast analysis of statins in pharmaceuticals by MECK. **Chromatographia**. Heidelberg v. 71, n. 3-4, p. 233-240, 2010.
- DESLYPERE, J.P. Clinical implications of the biopharmaceutical properties of fluvastatin. **American Journal of Cardiology**. New York, v. 73, n.14, p.D12-D17, 1994.
- DI PIETRO, G.; COELHO, E.B.; GELEILETE, T.M.; MARQUESA, M.P.; LANCHOTE, V.L. Chiral evaluation of fluvastatin in human plasma by high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry **Journal of Chromatography B**. Amsterdam, v.832, n. 2, p.256-261, 2006.
- DOGRUKOL-AK, D; KIRCALI, K.; TUNÇEL, M.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Validated analysis of fluvastatin in a pharmaceutical capsule formulation and serum by capillary electrophoresis. **Biomedical Chromatography**. London, v.15, n. 6, p.389-392, 2001.
-

- Drug Patent Watch. Disponível em
<<http://www.drugpatentwatch.com/ultimate/preview/tradename/LESCOL>>. acesso
em novembro de 2012
- EECKHAUT, A.V.; MICHOTTE, Y. Pharmacological Importance of Chiral Separations. In: EECKHAUT, A.V.; MICHOTTE, Y. **Chiral Separations by Capillary Electrophoresis**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 1-21.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on bioanalytical method validation**. Disponível em
<http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WW500109686.pdf>. Acesso em 24.Abril.2013.
- FANALI, S. Chiral separations by CE employing CDs. **Electrophoresis**. Weinheim, v.30, n. 1, p. S203-10, 2009.
- FANALI, S.; ATURKI, Z.; DESIDERIO, C. New strategies for chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis. **Forensic Science International**. Amsterdam. n.92, p.137–155, 1998.
- FORET, F.; KŘIVÁNKOVÁ, L.; BOČEK, P. **Capillary Zone Electrophoresis**. Weinheim: VCH, 1993. 346 p.
- FRANKE, J.P.; DE ZEEUW, R.A. Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis. **Journal of Chromatography B**. Amsterdam, v.713, n.1, p.51–59, 1998.
- GAL, J. The Discovery of Stereoselectivity at Biological Receptors: Arnaldo Piutti and the Taste of the Asparagine Enantiomers—History and Analysis on the 125th Anniversary. **Chirality**. New York, v.24, p.959–976, 2012.
- GOMES, F.P., GARCÍA, P. L., PORTO ALVES, J. M. , SINGH, A. K. , KEDOR-HACKMANN, E.R.M., MIRITELLO SANTORO, M. I. R. Development and validation of stability-indicating HPLC methods for quantitative determination of pravastatin, fluvastatin, atorvastatin, and rosuvastatin in pharmaceuticals'. **Analytical Letters**. London, v.42, n.12, p.1784 — 1804, 2009.
- GONG, Z.; CHANDLER, K.; WEBSTER, S.; KERLEY, R.; BUIST, S.; MCCORT-TIPTON, M. Simple and rapid determination of norethindrone in human plasma by supported liquid extraction and ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Talanta**. Oxford, v.91, p.77– 82, 2012.
- GOULART, M.R.; SILVEIRA, C.B.; CAMPOS, M.L.; ALMEIDA, J.A.; MANFREDI-COIMBRA, S.; OLIVEIRA, A.F. Metodologias para reutilização do resíduo de terra diatomácea, proveniente da filtração e clarificação da cerveja. **Química Nova**. São Paulo, v. 34, n. 4, 2011.
- GÜBITZ, G.; SCHMID, M.G. Cyclodextrin-Mediated Chiral Separations. . In: EECKHAUT, A.V.; MICHOTTE, Y. **Chiral Separations by Capillary Electrophoresis**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 87-108
-

GÜBITZ, G; SCHMID, M. G. Chiral separation by capillary electromigration techniques. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 1204, n. 2, p. 140-56, 2008.

HAMELIN, B. A.; TURGEON, J. Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. **Trends in Pharmacological Sciences**. Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 26-37, 1998.

HENNION, M.C.. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, n. 856 p. 3–54, 1999.

HERNÁNDEZ-BORGES, J., BORGES-MIQUELA, T.M., RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A., CIFUENTES, A. Sample treatments prior to capillary electrophoresis–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v.1153, n.1–2, p.214–226, 2007.

HEYDEN, Y.V., MANGELINGS, D., MATTHIJS, N., PERRIN, C., Chiral separations. In: AHUJA, S.; DONG, M. **Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC** (Eds.), Amsterdam : Elsevier, 2005. p. 447-498.

HUIE, C.W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Heidelberg, v. 373, n. 1-2, p.23-30, 2002.

IGEL, M.; SUDHOP, T.; VonBERGMANN, K. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase inhibitors (statins). **European Journal of Clinical Pharmacology**. Berlin, v. 57, n. 5, p. 357-364, 2001.

JANICKA, M. KOT-WASIK, A., NAMIEŚNIK, J. Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples. **Trends in Analytical Chemistry**. Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 209–224, 2010.

JIMIDAR, M. I. Theoretical consideration in performance of various modes of CE. In: AHUJA, S; JIMIDAR, M.I. (Ed.) **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**. London: Academic Press, 2008. p.9-42.

JOKUBAITIS, L.A. Development and pharmacology of fluvastatin. **British Journal of Clinical Practice**. Supplement. London, n.77A, p.11-15, 1996.

KAPNISSI, C.P. **Analytical Separations Using Packed And Open-Tubular Capillary Electrochromatography**, 2004. 151p. Dissertação. Disponível em: <http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-06212004-201435/unrestricted/Kapnissi_dis.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2010

KATHAWALA, F.G. HMG-CoA reductase inhibitors - an exciting development in the treatment of hyperlipoproteinemia. **Medicinal Research Reviews**. New York, v.11, n.2, p.121-146, 1991.

KIRCHHEINER, J.; KUDLICZ, D.; MEISEL, C.; BAUER, S.; MEINEKE, I.; ROOTS, I.; BROCKMOLLER, J.; Influence of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics and cholesterol-lowering activity of (-)-3S,5R-fluvastatin and (+)-3R,5S-fluvastatin in

healthy volunteers. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. St. Louis, v.74, n. 2, p.186-194, 2003.

KOLE, P.L.; VENKATESH, G.; KOTECHA, J.; SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**. London, v.25, n.1-2, p.199-217, 2011.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. **Capillary Electrophoresis principles and practice**. Germany: Springer-Verlag, 1993. 370 p.

LANCHOTE, V.L.; ROCHA, A.; DE ALBUQUERQUE, F.U.V.; COELHO, E.B.; BONATO, P.S. Stereoselective analysis of fluvastatin in human plasma for pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v.765, n.1, p.81-88, 2001.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2008, 1377p.

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

LORD, H., PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, n.1, v. 902, p.17–63, 2000.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. São Paulo, v. 53, n. 5, p. 596-607, 2009.

MAJORS, R.E. Supported Liquid Extraction: The Best-Kept Secret in Sample Preparation. **LGC EUROPE**. v. 25, n. 8, p. 430-436, 2012.

MARUSZAK, W.; MAREK, T.; MARGASINSKA, M.; ENGELHARDT, H. Application of carboxymethyl- β -cyclodextrin as a chiral selector in capillary electrophoresis for enantiomer separation of selected neurotransmitters. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v.926, p. 327-336, 2001.

MARUSZAK, W.; SCHMID, M. G.; GÜBITZ, G.; EKIERT, E., TROJANOWICZ, M. Separation of enantiomers by capillary electrophoresis using cyclodextrins. **Methods in Molecular Biology**. Clifton, v. 243, p. 275-89, 2004.

MAYER, B.X. How to increase precision in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 907, n.1-2, p. 21-37, 2001.

MENGE, T.; HARTUNG, H. P.; STUVE, O. Statins – a cure-all for the brain? **Nature Reviews Neuroscience**. London, v. 6, n. 4, p. 325-331, 2005.

MORAES, M.L.L., PEREIRA, S.L, ALVES, E., TAVARES, M.F.M. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE): parte 1. Manipulação da velocidade eletroforética do analito. **Química Nova**. São Paulo, v. 32, n. 4, p.1041-1046, 2009.

- NAKASHIMA, A., SAXERA, C., NIINA, M., MASUDA, N., IWASAKI, K., FURUKAWA, K. Determination of fluvastatin and its five metabolites in human plasma using simple gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**. Amsterdam, n.760, p.17–25, 2001.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Coordenação de tradução de Arnaldo Antônio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. São Paulo: Sarvier, 2006.4 ed. 1202 p.
- NHUJAK, T.; SASTRAVAHA, C.; PALANUVEJ, C.; PETSOM, A. Chiral separation in capillary electrophoresis using dual neutral cyclodextrins: Theoretical models of electrophoretic mobility difference and separation selectivity. **Electrophoresis**. Weinheim, v. 26, n.20, p.3814-3823, 2005.
- NOROSKI, J.E., MAYO, D.J, MORAN, M. Determination of the enantiomer of a cholesterol lowering drug by cyclodextrin-modified micelar electrokinetic chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Oxford, v. 13, n. 1, p. 45-52, 1995.
- NOVÁKOVÁ, L., VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**. Amsterdam, v. 656, n.1–2, p.8–35, 2009.
- O'FLAHERTY, B.; NUNNALLY, B. K. Equipment considerations for capillary electrophoresis. In: AHUJA, S; JIMIDAR, M.I. (Ed.) **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**. London: Academic Press, 2008. v. 9, p. 43-62.
- PATEL, B.K.; HUTT, A.J. Stereoselectivity in drug action and disposition: an overview. In: **Chirality in Drug Design and Development**. New York: Marcel Dekker, 2004. p.136-187.
- PERLATTI, P., CARRILHO, E., AGUIAR, F.A. Sample stacking: a versatile approach for analyte enrichment in CE and microchip-CE. In: GARCIA, C.D., CHUMBIMUNITORRES, K.Y., CARRILHO, E. (Eds). **Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis – principles, applications, and limitations**. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2013.p. 23-37.
- PFFEFKORN, J.A. Second generation HMG-CoA inhibitors. In: JOHNSON, D.S.; LI, J.J. **The art of drug synthesis**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2007. 276 p.
- PLOSKER, G. L.; WAGSTAFF, A. J. Fluvastatin: a review of its pharmacology and use in the management of hypercholesterolaemia. **Drugs**. New York, v. 51, n. 3, p. 433-59, 1996.
- PREINERSTORFER, B.; LAMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Synthesis and application of novel phenylboronate affinity materials based on organic polymer particles for selective trapping of glycoproteins. **Journal of Separation Science**. Weinheim, v. 32, n. 10, p. 1673-85, 2009
-

- QUEIROZ, M.E.C.; LANCAS, F.M. Analysis of drugs in biological samples: automated "in-tube" solid-phase microextraction and high performance liquid chromatography. **Química Nova**. São Paulo, v. 28, n. 5, 2005 .
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**. São Paulo, v. 24, n. 1, 2001.
- RIEKKOLA, M.L.; WIEDMER, S.K.; VALKÓ, I.E.; SIRÉN H. Selectivity in capillary electrophoresis in the presence of micelles, chiral selectors and non-aqueous media. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 792, p.13-35, 1997.
- ROCHA, A.; COELHO, E. B.; LANCHOTE, V. L. Stereospecific disposition of fluvastatin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. Ottawa, v. 80, p. 1071-1075, 2002.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, L.; CASTRO-PUYANA, M.,. MARINA, M.L.; CREGO, A.L. Recent approaches in sensitive enantioseparations by CE. **Electrophoresis**. Weinheim, n.33, p.228–242, 2012.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, L.; GARCÍA-RUIZ, C. MARINA, M.L.; CREGO, A.L. Recent approaches for enhancing sensitivity in enantioseparations by CE. **Electrophoresis**. Weinheim, v.31, p. 28-43, 2010.
- SCHMID, M.G., WIRNSBERGER, K., JIRA, T., BUNKE, A., GÜBITZ, G. Capillary electrophoretic chiral resolution of vicinal diols by complexation with borate and cyclodextrin: comparative studies on different cyclodextrin derivatives. **Chirality**. n. 9, p.153–156, 1997.
- SCHMID, M.G.; GÜBITZ, G. Enantioseparation by chromatographic and electromigration techniques using ligand-exchange as chiral separation principle. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Heidelberg, v.400, p.2305 – 2316, 2011.
- SCHMIDT, M.; DZOGBETA, S.;BOYER, M.P. Inhibition of *Candida albicans* by Fluvastatin Is Dependent on pH. **Research Letters in Biochemistry**. Cairo, v. 2009, p.4, 2009.
- SCHURIG, V. Editorial on “Enantioseparations by using capillary electrophoretic techniques – the story of 20 and a few more years” **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v. 1168, n. 1-2, 44 p., 2007.
- SCRIBA, G. K. E. Cyclodextrins in capillary electrophoresis enantioseparations – Recent developments and applications. **Journal of Separation Science**. Weinheim, v. 31, p.1991 – 2011, 2008.
- SCRIBA, G. K. E. Enantiomers separations by capillary electrophoresis. In: Subramanian, G. **Chiral separations techniques: a practical approach**, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007. 3 ed., p. 333
- SCRIBA, G.K.E. Fundamental aspects of chiral electromigration techniques and application in pharmaceutical and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Oxford, v.55, p.688–701, 2011.
-

- SCRIPTURE, C.D.; PIEPER, J.A. Clinical Pharmacokinetics of Fluvastatin. **Clinical Pharmacokinetics**. New York, v.40, n.4, p.263-281, 2001.
- SERVAIS, A.C., CROMMEN, J., FILLET M., Factor Influencing Cyclodextrin-Mediates Chiral . In: **Chiral separations by capillary electrophoresis** (Chromatographic science series ; v.100), Boca Raton: CRC Press, 2010, 87-108p.
- SHAW, S. M.; FILDES, J. E.; YONAN, N.; WILLIAMS, S. G. Pleiotropic effects and cholesterol-lowering therapy. **Cardiology**. Basel, v. 112, p. 4-12, 2009.
- SILVA, J. A F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**. São Paulo, v. 30, n. 3, 2007.
- SIMÓ, C.; GARCÍA-CAÑAS, V.; CIFUENTES, A. Chiral CE-MS. **Electrophoresis**. Weinheim, v.31, p.1442-1456, 2010
- SKOOG, D.A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Outros métodos de separação. In: _____(Org.). **Fundamentos de química analítica**. Tradução: Marco Tadeu Grassi. São Paulo: Thomson Learning, 2006. 999p.
- SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.G. Estereoquímica: moléculas quirais. In: SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.G. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: LTC, 2005. v.1, p. 183-195.
- STALCUP, A.M. Chiral separations by capillary electrophoresis. In: BUSCH, K.W.; BUSCH, M.A. (Eds.) **Chiral Analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2006. p.241–275
- STEFANSSON, M., NOVOTNY, M. Electrophoretic resolution of monosaccharide enantiomers in borate-oligosaccharide complexation media. **Journal of the American Chemical Society**. Washington, n.115, p.11573-11580, 1993.
- STEINER, S.A.; FRITZ, J.S. Separation of organic cations using novel background electrolytes by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v.1192, n.1, p. 152–156, 2008.
- SUNTORN SUK, L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Heidelberg, n.398, p.29–52, 2010.
- TADEY, T., PURDY, W.C. Capillary electrophoretic separation of nucleotide isomers via complexation with cyclodextrin and borate. **Journal of Chromatography B**. Amsterdam, n.657, p. 365-372, 1994.
- TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**. São Paulo, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.
- TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**. São Paulo, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.
- TESTA, B.; MAYER, J. M. Chiral Recognition in Biochemical Pharmacology: An Overview. In: EICHELBAUM, M., TESTA, B., SOMOGYI, A. **Stereochemical**

Aspects of Drug Action and Disposition. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2003. v.153. p.143-159

The Pharma Letter. Disponível em
<<http://www.thepharmaletter.com/file/112592/mylan-debuts-lescol-copy-impax-challenges-gralise-patent.html>>. Acesso em novembro de 2012.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 31. ed. Rockville, 2008.

TORÉSON, H.; ERIKSSON, B.M. Determination of fluvastatin enantiomers and the racemate in human blood plasma by liquid chromatography and fluorometric detection. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, v.729, n.1-2, p.13-18, 1996.

TORÉSON, H.; ERIKSSON, B.M. Liquid chromatographic determination of fluvastatin and its enantiomers in blood plasma by automated solid-phase extraction. **Chromatographia**, v. 45, n.1, p.29-34,1997.

TRUNG, T.Q.; DUNG, P.T.; HOAN, N.N.; KIM, D.J.; LEE, J.H.; KIM, K.H. Chiral Separation of Fluvastatin Enantiomers by Capillary Electrophoresis. **Archives of Pharmacol Research**. Seoul, v.31, n.8, p.1066-1072, 2008.

Van HOUT, M.W.J., NIEDERLANDER, H.A.G., de ZEEUW, R.A., de JONG, G.J. New developments in integrated sample preparation for bioanalysis. In: SMITH, R.M. **Handbook of analytical separations**. Amsterdam: Elsevier, 2003. v.4, p.1-3.

VENTURINI, C.G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 2, 2008.

VERLEYSSEN, K.; SANDRA, P.; Separation of chiral compounds by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**. Weinheim, v.19, p.2798-2833, 1998.

VESPALEC, R. Principles of Chiral Separations by Free-Solution Electrophoresis. In: **Chiral separations by capillary electrophoresis** (Chromatographic science series ; v.100), Boca Raton: CRC Press, 2010, 87-108p.

WEINBERGER, R. **Practical capillary electrophoresis**, 2. Ed. New York: Academic Press, 2000. 462 p.

WELLS, D.A. Liquid-liquid extraction: High throughput techniques. In: WELLS, D.A. (Ed). **High throughput bioanalytical sample preparation: methods and automation strategies**. Oxford: Elsevier, 2003. v.5, p. 277-306.

WELLS, M.J.M. Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids. In: Mitra, S. (Ed.) **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2003. v. 162, p.37-131.

WESTON, A.; BROWN, P.R. Data manipulation. In: _____ (Org.) **HPLC and CE: principles and practice**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 235.

WREN, S. Enantiomers and separation. **Chromatographia**. v. 54, n.1 supplement. p. S-7-S-14, 2001

YE, Y.K., LORD, B., STRINGHAM, R.W. Memory effect of mobile phase additives in chiral separations on a Chiralpak AD column. **Journal of Chromatography A**. Amsterdam, n. 945, p.139–146, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação do presente projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da FCFRP – USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 42/2011
kms

Ribeirão Preto, 20 de junho de 2011.

À

PROFA. DRA. CRISTIANE MASETTO DE GAITANI

Pós-graduanda Jennifer Michiko Chauca Yokoya
DFQ - FCFRP-USP

Prezada Senhora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 91ª Sessão Ordinária, realizada em 17/06/2011, a extensão do projeto de pesquisa intitulado "ANÁLISE ENANTIOSELETIVA DE FLUVASTATINA EM PLASMA EMPREGANDO A ELETROFORESE CAPILAR", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 199.

Informamos que conforme Carta Circular003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2 d), o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retirada pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador.

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

Appendice

APÊNDICE

Apêndice 1 - Procedimentos realizados para avaliar a extração em fase sólida dos enantiômeros da FLV

Etapa SPE	Tratamen to prévio do plasma	Lavagem da coluna	Eluição da coluna	Cartucho
Proce dimen to		Solvente	Solvente	
1	150 µL HCl 0,1 mol.L ⁻¹	2 mL água + 2 mL ACN	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
2	-	2 mL água + 2 mL ACN	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
3	1 mL solução tampão acetato de sódio 0,75mol.L ⁻¹ pH 4	2 mL água:ACN (1:1, v/v) + 2 mL ACN	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
4	150 µL HCl 0,1 mol.L ⁻¹	2 mL água:ACN (1:1, v/v) + 2 mL ACN	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
5	150 µL HCl 0,1 mol.L ⁻¹	2 mL água + 2 mL MeOH:água (1:1, v/v)	2 mL ACN	J.T. Baker – C18
6	150 µL HCl 0,1 mol.L ⁻¹	2 mL água + 2 mL MeOH:água (1:1, v/v)	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
7	150 µL HCl 0,1 mol.L ⁻¹	2 mL água + 2 mL MeOH:água (1:1, v/v)	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
8	-	2 mL água + 2 mL de ACN	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
9	-	2 mL água + 2 mL ACN	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18

Etapa SPE	Tratament o prévio do plasma	Lavagem da coluna	Eluição da coluna	Cartucho
Proce dimen to		Solvente	Solvente	
10	-	4 mL de solução metanólica 20 % em ácido acético 2%	2 mL MeOH	J.T. Baker – C18
11	1 mL ACN	5 mL água + 5 mL ACN	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
12	-	5 mL água + 5 mL ACN	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
13	-	2 mL água + 2 mL ACN	2 mL solução de ACN e DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
14	-	5 mL água + 5 mL ACN e DEA 0,4 %	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
15	-	5 mL água + 5 mL ACN e DEA 0,2%	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
16	-	5 mL água + 5 mL ACN e DEA 0,2%	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
17	-	5 mL água + 5 mL ACN e DEA 0,2%	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
18	-	5 mL água + 5 mL ACN e DEA 0,2%	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
19	-	5 mL água + 5 mL ACN e DEA 0,2%	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C8
20	-	5 mL água + 5 mL ACN e DEA 0,2%	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	Supelco – C18

Etapa SPE	Tratament o prévio do plasma	Lavagem da coluna	Eluição da coluna	Cartucho
Proce- dimen- to		Solvente	Solvente	
21	-	5 mL água + 5 mL ACN e DEA 0,2%	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	Agilent – C18
22	-	5 mL água + 5 mL ACN e DEA 0,2%	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	Phenomenex – C18
23	1 mL solução tampão acetato de sódio 0,75mol.L ⁻¹ pH 4	5 mL água + 5 mL ACN e DEA 0,2%	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
24	150 µL NaOH 1mol.L ⁻¹	5 mL água + 5 mL ACN e DEA 0,2%	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
25	200 µL de metabissulfito de sódio 4mg.mL ⁻¹ + 150 µL HCl 1 mol.L ⁻¹	5 mL água + 5 mL ACN e DEA 0,2%	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
26	-	2 mL água + 2 mL ACN	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
27	1 mL de água	5 mL água + 5 mL ACN e DEA 0,2%	2 mL solução metanólica DEA 0,2%	J.T. Baker – C18
28	-	3 mL ácido fórmico 2% + 3 mL MeOH	3 mL solução metanólica de NH ₄ OH 5%	Spe-ed - WAX NH2
29	ACN	3 mL ácido fórmico 2% + 3 mL MeOH	3 mL solução metanólica de NH ₄ OH 5%	Spe-ed - NH2 WAX
30	Solução tampão fosfato 0,1mol.L ⁻¹ pH7	3 mL ácido fórmico 2% + 3 mL MeOH	3 mL solução metanólica de NH ₄ OH 5%	Waters - WAX

Etapa SPE	Tratament o prévio do plasma	Lavagem da coluna	Eluição da coluna	Cartucho
Proce dimen to		Solvente	Solvente	
31	-	3 mL NH ₄ OH 5% + 3 mL MeOH	2 mL solução metanólica de ácido fórmico 2%	Waters - MAX

YOKOYA, J.M.C. Análise enantiosseletiva da fluvastatina por eletroforese capilar. 2013. **100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.**

ERRATA

Folha Parágrafo/linha

8

1/4

Onde se lê

$$\mu_e = \left(\frac{q}{6\pi} \right) \eta r$$

Leia-se

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$