

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêutico

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para
identificação e doseamento de medicamentos
anti-esquistossomose**

ELENICE LUDUVINA DA SILVA SANTOS

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Segunda Aurora Prado

SÃO PAULO
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêutico

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para
identificação e doseamento de medicamentos
anti-esquistossomose**

Versão original

ELENICE LUDUVINA DA SILVA SANTOS

Dissertação para obtenção do Grau de
Mestre

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Segunda Aurora Prado

SÃO PAULO
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Santos, Elenice Luduvina da Silva
S237des Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para
identificação e doseamento de medicamentos anti-esquistossomose /
Elenice Luduvina da Silva Santos. -- São Paulo, 2015.
114p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Aurora Prado, Maria Segunda

1. Cromatografia líquida de alta eficiência : Análise química :
Farmacologia 2. Eletroforese capilar, I. T. II. Aurora Prado, Maria
Segunda, orientador.

615.19015 CDD

ELENICE LUDUVINA DA SILVA SANTOS

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para
identificação e doseamento de medicamentos
anti-esquistossomose**

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado

Orientadora / Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de _____

*Da minha aldeia vejo quanto da terra se pode ver no Universo...
Por isso a minha aldeia é tão grande como outra terra qualquer
Porque eu sou do tamanho do que vejo
E não do tamanho da minha altura...*

*Nas cidades a vida é mais pequena
Que aqui na minha casa no cimo deste outeiro.
Na cidade as grandes casas fecham a vista à chave,
Escondem o horizonte, empurram o nosso olhar para longe de todo o céu,
Tornam-nos pequenos porque nos tiram o que os nossos olhos nos podem
dar,
E tornam-nos pobres porque a nossa única riqueza é ver.*

Alberto Caeiro, em "O Guardador de Rebanhos – Poema VII"

Heterônimo de Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À Deus por todos os caminhos que Ele me conduziu para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais Cicero Forencio e Severina Luduvina (Dona Nena), que mesmo com pouca instrução me incentivaram a estudar sempre.

À minha irmã Edilene Luduvina (*in memoriam*) com quem dividi parte da vida e que estará sempre em meus pensamentos e coração.

Ao meu irmão Evandro Florencio e sobrinho Alexanddy Medeiros, que seja uma inspiração e incentivo para que estudem.

Ao meu marido Ricardo Santos, pelo companheirismo, incentivo e amor.

À minha filha Helena Luduvina, meu maior incentivo para concluir esse trabalho.

À minha amiga Audrei Santos, por toda a ajuda com as amostras e realização de alguns testes.

À minha amiga Claudia Oliveira, ombro para as lamentações e palavras de incentivo para finalizar este trabalho.

Aos colegas de laboratório: Aline, Andréia, Antônio, Wellington, Laura e Marcela, pelo companheirismo e troca de informações.

Aos professores e funcionário do laboratório de controle de qualidade de fármacos, Profa.Dra. Érika Rosa Maria Kedor, Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello, ao Prof. Dr. Anil K. Singh e a funcionária Íria Raimunda da Silva, obrigada pelas informações e incentivo.

Ao funcionário da Pós – Graduação Davi Olímpio de Lima Filho, obrigada por toda ajuda, orientação e amizade.

A Profa.Dra. Maria Aurora que aceitou me orientar nesse trabalho e caminhou comigo até o final...

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Aos meus colegas professores, coordenadores e diretores da Escola Estadual Cidade de Hiroshima, por toda compreensão e incentivo.

À todos amigos e familiares, muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 <i>Schistosoma mansoni</i> e a esquistossomose	5
2.2 Oxamniquina.....	7
2.2.1 Propriedades físico-químicas ³³	7
2.2.2 Farmacodinâmica	8
2.2.3 Farmacocinética	8
2.2.4 Efeitos adversos e contraindicações	9
2.2.5 Administração.....	9
2.3 Métodos Indicativos de Estabilidade.....	10
2.3.1 Geração da Amostra	10
2.4 Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)	13
2.5 Eletroforese capilar (CE).....	14
2.5.1 Classificação da eletroforese capilar	15
2.5.1.1 Eletroforese capilar de zona (CZE)	16
2.5.1.2 Cromatografia eletrocínética micelar (MEKC).....	16
2.5.1.3 Cromatografia eletrocínética microemulsão (MEEKC)	17
2.5.1.4 Eletroforese capilar em gel (CGE).....	17
2.5.1.5 Focalização isoelétrica capilar (CIEP)	18
2.5.1.6 Isotacoforese capilar (CITP).....	18
2.5.1.7 Eletrocromatografia capilar (CEC).....	18
2.5.2 Vantagens e limitações da CE.....	18
2.6 Validação de Metodologia analítica	19
2.6.1 Parâmetros de validação	21
2.6.2 Definição dos parâmetros de validação	22
2.6.2.1 Linearidade.....	22
2.6.2.2 Precisão.....	23
2.6.2.3 Exatidão.....	24
2.6.2.4 Robustez	25

2.6.2.5	Limite de detecção	26
2.6.2.6	Limite de quantificação	26
2.6.2.7	Especificidade e seletividade.....	26
3.	OBJETIVO	28
3.1	Objetivo geral.....	28
3.2	Objetivos específicos	28
4.	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Materiais	29
4.1.1.	Reagentes, solventes e soluções	29
4.1.2.	Substâncias empregadas como padrão.....	29
4.1.3.	Substâncias empregadas como candidatas a padrão interno	29
4.1.4.	Amostra comercial, Simulada e Placebo	30
4.2.5	Equipamentos.....	30
4.3.5	Método de identificação da oxamniquina.....	30
4.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	31
4.4.1	Preparo do cromatógrafo líquido	32
4.4.2	Preparo das soluções padrão e de trabalho	32
4.4.3	Especificidade ou seletividade.....	33
4.4.3.1	Hidrólise ácida	36
4.4.3.2	Hidrólise básica	36
4.4.3.3	Hidrólise oxidativa	36
4.4.3.4	Hidrólise neutra	37
4.4.3.5	Fotólise.....	37
4.4.3.6	Térmica.....	38
4.4.4	Linearidade.....	38
4.4.5	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	39
4.5	Desenvolvimento do método de quantificação da oxamniquina por eletroforese capilar de zona (CZE)	41
4.5.1.	Preparo das soluções tampão	41
4.5.2.	Preparo das soluções padrão.....	42
4.6.1.1.	Hidrólise ácida	47

4.6.1.2.	Hidrólise básica	48
4.6.1.3.	Hidrólise oxidativa	49
4.6.1.4.	Hidrólise neutra	50
4.6.1.5.	Fotólise.....	51
4.6.1.6.	Térmica.....	53
4.6.2.	Linearidade.....	54
4.6.3.	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	55
4.6.4.	Repetibilidade (intra-dia)	56
4.6.5.	Repetibilidade (inter-dia)	56
4.6.6.	Exatidão.....	56
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	Método de identificação da oxamniquina.....	58
5.2	Metodologia analítica desenvolvida por cromatografia líquida de alta eficiência .	59
5.2.1.	Testes preliminares	59
5.2.2.	Verificação dos parâmetros para cromatografia líquida de alta eficiência.....	60
5.3	Validação do método por HPLC	63
5.3.1.	Especificidade	63
5.3.2.	Linearidade.....	74
5.3.3	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	76
5.3.4.	Precisão.....	76
5.3.5.	Precisão intermediária	77
5.3.6.	Exatidão.....	78
5.4	Metodologia analítica desenvolvida por eletroforese capilar.....	78
5.4.1.	Testes preliminares	78
5.4.1.1.	Verificação de comprimento de onda adequado	79
5.4.1.2.	Verificação de concentração de eletrólito adequado	80
5.4.1.3.	Escolha do padrão interno.....	83
5.5	Validação do método por CE	88
5.5.1.	Especificidade	88
5.5.1.	Linearidade.....	100
5.5.2.	Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)	102

5.5.3.	Precisão.....	103
5.5.4.	Precisão intermediária	104
5.5.5.	Exatidão.....	105
6.	CONCLUSÃO.....	107
7.	REFERÊNCIAS.....	108
8.	ANEXOS	114

SANTOS, E.L.S. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para identificação e doseamento de medicamentos anti-esquistossomose**. 2015. f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos – Área de Produção e Controle Farmacêuticos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015].

RESUMO

A esquistossomose ou bilharziose, é uma doença produzida por trematódeos do gênero *Schistosoma*. Dentre as 19 espécies reconhecidas, cinco infectam primariamente o homem: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. Mekongi*. O número de pessoas com infecção esquistossomótica, em todo o mundo, foi estimado em 200 milhões sendo sua maioria na Ásia e África. Na América do Sul e Caribe encontram-se vários milhões de casos sendo uma estimativa de mais de seis milhões de casos no Brasil. Os fármacos utilizados para o tratamento desta enfermidade são o praziquantel e o oxamniquina, sendo este último o princípio ativo do produto Mansil[®] cápsulas produzido pela indústria farmacêutica Pfizer. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar métodos analíticos por eletroforese capilar (CE) e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), rápidos, seletivos e confiáveis para a determinação de oxamniquina em formulações farmacêuticas e de sua impureza (uk-3883), quando houver. A separação cromatográfica foi realizada usando a coluna Thermo[®] Nucleosil C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm), com fase móvel constituída por água acidificada com 0,1% ácido ortofosfórico:metanol (40:60 v/v), trabalhando com vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 2 µL. A temperatura da coluna foi controlada em 20 °C e a detecção foi realizada na região do UV em 254 nm. O tempo de retenção da oxamniquina foi de 1,9 min e da uk-3883 5,1 min. O método por eletroforese capilar de zona (CZE) foi desenvolvido utilizando capilar de sílica fundida de 20 cm (comprimento efetivo) x 50 µm d.i. e eletrólito constituído da solução tampão fosfato de sódio monobásico 30 mmol L⁻¹, pH 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico 10%: metanol 18% v/v. Injeção hidrodinâmica 0,5 psi/3 s; voltagem aplicada de +25 kV, temperatura de 20 °C e detecção no UV de 254 nm. Os métodos analíticos foram validados de acordo com os requerimentos vigentes da ANVISA, ICH e Farmacopéia Americana. Portanto, os métodos propostos demonstraram linearidade ($R^2 > 0,99$), precisão (%DPR < 2%), exatidão (>98%, expressado em porcentagem de recuperação) e adequabilidade para a quantificação da oxamniquina em formas farmacêuticas comerciais.

Palavras-chave: Oxamniquina. Esquistossomose. Cromatografia líquida de alta eficiência. Eletroforese capilar. Validação de métodos analíticos.

SANTOS, E.L.S. **Development and validation of analytical methodology for identification and dosing of medicines anti – schistosomiasis.** 2015. f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos – Área de Produção e Controle Farmacêuticos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015].

ABSTRACT

Schistosomiasis or bilharzia, is a disease caused by trematodes of the gender *Schistosoma*. Among the 19 recognized species, five primarily infect humans: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* and *S. mekongi*. The number of people with schistosomiasis infection worldwide was estimated at 200 million being mostly living in Asia and Africa. In South America and the Caribbean are several million of cases and in Brazil it is stimated of more than six million of cases. The drugs used for the treatment of this disease is praziquantel and oxamniquine, the latter being the active principle of the Mansil® capsules produced by Pfizer pharmaceutical industry. This study aimed to develop and validate fast, selective and reliable analytical methods through capillary electrophoresis (CE) and high-performance liquid chromatography (HPLC), for the determination of oxamniquine in pharmaceutical formulations and its impurity (UK-3883) if any. The chromatographic separation was performed using a Thermo® Nucleosil C18 column (150 mm x 4.6 mm x 5 µm) the mobile phase was composed of water with 0.1% orthophosphoric acid: methanol (40:60 v/v); the flow rate was 1.0 ml min⁻¹. The column temperature was controlled at 20 ° C and the detection was performed with UV detector at 254 nm. The retention time for oxamniquine and its impurity (uk-3883) were 1.9 and 5.1 minutes, respectively. The capillary zone electrophoresis method was developed using an uncoated fused-silica capillary of 20 cm effective length x 50 µm i.d. the electrolyte was composed of 30 mmol L⁻¹ sodium phosphate monobasic buffer solution, pH 2.5 adjusted with ortho-phosphoric acid 10%: 18% methanol v(/v). Samples were injected hydrodynamically at 0.3 psi for 3 s, the detection was made by UV absorption at 254 nm, the capillary temperature was 20°C and the applied voltage was +25 kV. Analytical methods were validated in accordance with the ANVISA, ICH and United States Pharmacopoeia guidelines. Therefore, the porposed methods showed linearity (R²>0,99), precision (%RSD <2%), accuracy (>98%, expressed as recovery percentage) and suitability for the quantification of oxamniquine in commercial dosage forms.

Keywords: oxamniquine. Schistosomiasis. High Performance Liquid chromatography. Capillary electrophoresis. Analytical methods validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da oxamniquina.....	7
Figura 2. Estrutura química da substância relacionada à oxamniquina.....	7
Figura 3. Esquema básico da cromatografia a líquido de alta eficiência ³⁸	14
Figura 4. Esquema básico do sistema de eletroforese capilar ⁴³	15
Figura 5. Espectro de absorção no ultravioleta de oxamniquina 5,0 µg. mL ⁻¹	58
Figura 6. Espectro de absorção da oxamniquina na região do infravermelho (IR).....	59
Figura 7. Cromatograma da solução padrão contendo oxamniquina 100,0 µg.mL ⁻¹ , uk-3883 100,0 µg.mL ⁻¹ . Coluna: Nucleosil C18 e 150 x 4,6 mm x 5µm (Thermo); fase móvel ACN : água (90:10, v/v) temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e volume de injeção 2µL.	61
Figura 8. Cromatograma da solução padrão contendo oxamniquina 100,0 µg.mL ⁻¹ , uk-3883 100,0 µg.mL ⁻¹ . Coluna: Nucleosil C18 e 150 x 4,6 mm x 5µm (Thermo); fase móvel ACN : água (75:25, v/v) temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e volume de injeção 2µL.	61
Figura 9. Cromatograma da solução padrão contendo oxamniquina 100,0 µg.mL ⁻¹ , uk-3883 100,0 µg.mL ⁻¹ . Coluna: Nucleosil C18 e 150 x 4,6 mm x 5µm (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (90:10, v/v) temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e volume de injeção 2µL.....	61
Figura 10. Cromatograma da solução padrão contendo oxamniquina 100,0 µg.mL ⁻¹ , uk-3883 100,0 µg.mL ⁻¹ . Coluna: Nucleosil C18 e 150 x 4,6 mm x 5µm (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (80:20, v/v) temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e volume de injeção 2µL.....	62
Figura 11. Cromatograma da solução padrão contendo oxamniquina 100,0 µg.mL ⁻¹ , uk-3883 100,0 µg.mL ⁻¹ . Coluna: Nucleosil C18 e 150 x 4,6 mm x 5µm (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e volume de injeção 2µL.....	62
Figura 12. Cromatograma da solução diluente (água purificada : metanol 20:80 v/v). Coluna: Nucleosil C18 e 150 x 4,6 mm x 5µm (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e volume de injeção 2µL.....	65
Figura 13. Cromatograma da solução placebo. Coluna: Nucleosil C18 e 150 x 4,6 mm x 5µm (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e volume de injeção 2µL.....	65
Figura 14. Cromatograma da solução padrão contendo oxamniquina 100,0 µg.mL ⁻¹ , uk-3883 100,0 µg.mL ⁻¹ . Condição: HCl 1 mmol L ⁻¹ /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e 150 x 4,6 mm x 5µm (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e volume de injeção 2µL.....	65

- Figura 15. Cromatograma obtido após hidrólise ácida da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição: HCl 1 mmol L^{-1} /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40 v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 66
- Figura 16. Cromatograma obtido após hidrólise básica da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição: NaOH 1 mmol L^{-1} /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 66
- Figura 17. Cromatograma obtido após hidrólise neutra da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição: 80°C /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 66
- Figura 18. Cromatograma obtido após estresse oxidativo da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição: HCl 1 mmol L^{-1} /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 67
- Figura 19. Cromatograma obtido após estresse por fotólise da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 67
- Figura 20. Cromatograma obtido após estresse térmico da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição: 60°C /7 dias. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 67
- Figura 21. Cromatograma da solução diluente (água purificada : metanol 20:80 v/v). Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 70
- Figura 22. Cromatograma da solução placebo. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 70
- Figura 23. Cromatograma da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição: HCl 1 mmol L^{-1} /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 71
- Figura 24. Cromatograma obtido após hidrólise ácida da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição: HCl 1 mmol L^{-1} /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 71

- Figura 25. Cromatograma obtido após hidrólise básica da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição: NaOH 1 mmol L^{-1} /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 71
- Figura 26. Cromatograma obtido após hidrólise neutra da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição: 80°C /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 72
- Figura 27. Cromatograma obtido após estresse oxidativo da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição: H_2O_2 /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 72
- Figura 28. Cromatograma obtido após estresse por fotólise da solução padrão de trabalho contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 72
- Figura 29. Cromatograma obtido após estresse térmico da solução padrão de trabalho contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição: 60°C /7 dias. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$ 73
- Figura 30. Curva analítica resultante da análise da solução padrão de Oxamniquina utilizando HPLC..... 74
- Figura 31. curva analítica resultante da análise da solução padrão de Uk-3883 utilizando HPLC 75
- Figura 32. Eletroferograma da solução padrão de oxamniquina $100,0 \mu\text{g/mL}$ por CZE Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 25 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico, Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector $\times 50 \mu\text{m d.i.}$, tensão aplicada $+20 \text{ kV}$, temperatura 20°C , detecção UV em 205 nm e injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi/3s}$ 79
- Figura 33. Eletroferograma da solução padrão de oxamniquina $100,0 \mu\text{g/mL}$ Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 25 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico, Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector $\times 50 \mu\text{m d.i.}$, tensão aplicada $+20 \text{ kV}$, temperatura 20°C , detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi/3s}$ 80
- Figura 34. Eletroferograma da solução padrão de oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 25 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector $\times 50 \mu\text{m d.i.}$, tensão aplicada $+20 \text{ kV}$, temperatura 20°C , Detecção UV em 205 nm e injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi/3s}$ 81

- Figura 35. Eletroferograma da solução padrão de oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido ortofosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s..... 81
- Figura 36. Eletroferograma da solução padrão de oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condições: f eletrólito: fosfato de sódio monobásico 35 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido ortofosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s..... 82
- Figura 37. Eletroferograma da solução padrão de oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 40 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido ortofosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s..... 82
- Figura 38. Eletroferograma da solução padrão de atenolol $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (p.i) Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido ortofosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s..... 84
- Figura 39. Eletroferograma da solução padrão de cefalexina $100,0 \mu\text{g/mL}$ (p.i) Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido ortofosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s..... 84
- Figura 40. Eletroferograma da solução padrão de clozapina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (p.i) Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido ortofosfórico 10%. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s..... 85
- Figura 41. Eletroferogramas da solução padrão (M) contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e clozapina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; solução padrão de uk-3883 (1) $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; solução padrão de oxamniquina (2) $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e solução padrão de clozapina (3) $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por CZE. Condições: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s..... 85
- Figura 42. Eletroferograma da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 10% de metanol . Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s..... 86

- Figura 43. Eletroferograma da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s..... 87
- Figura 44. Eletroferograma do eletrólito. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s. 90
- Figura 45. Eletroferograma da solução placebo. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s..... 90
- Figura 46. Eletroferograma da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: Tempo, 0 horas. Eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s..... 91
- Figura 47. Eletroferograma obtido após hidrólise ácida da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: HCl 1 mmol L^{-1} /7 dias. Eletrólito: fosfato de sódio monobásico $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s. 92
- Figura 48. Eletroferograma obtido após hidrólise básica da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: NaOH 1 mmol L^{-1} / 7 dias eletrólito: fosfato de sódio monobásico $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s. 92
- Figura 49. Eletroferograma obtido após hidrólise neutra da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: 80°C /7 dias eletrólito: fosfato de sódio monobásico $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s. 93
- Figura 50. Eletroferograma obtido após estresse oxidativo da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: H_2O_2 3% / 7 dias eletrólito: fosfato de sódio monobásico $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s. 93

- Figura 51. Eletroferograma obtido após estresse por fotólise da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s..... 94
- Figura 52. Eletroferograma obtido após estresse térmico da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: 60°C / 7 dias eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s..... 94
- Figura 53. Eletroferograma da solução placebo. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s..... 96
- Figura 54. Eletroferograma da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: Tempo 0 horas. Eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s..... 96
- Figura 55. Eletroferograma obtido após hidrólise ácida da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: HCl 1 mmol L^{-1} . Eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s..... 97
- Figura 56. Eletroferograma obtido após hidrólise básica da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: NaOH 1 mmol L^{-1} . Eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s..... 97
- Figura 57. Eletroferograma obtido após hidrólise neutra da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: 80°C / 7 dias. Eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s..... 98
- Figura 58. Eletroferograma obtido após estresse oxidativo da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: H_2O_2 3% / 7 dias eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s..... 98

- Figura 59. Eletroferograma obtido após estresse por fotólise da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s..... 99
- Figura 60. Eletroferograma obtido após estresse térmico da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: 60°C / 7 dias. Eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s..... 99
- Figura 61. Curva analítica resultante da análise da solução padrão de Oxamniquina utilizando CE 101
- Figura 62. Curva analítica resultante da análise da solução padrão de Uk-3883 utilizando CE102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros necessários durante a validação de método ³⁸	22
Tabela 2 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para métodos analíticos ²⁸	23
Tabela 3 - Exemplos de fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico ³⁸	25
Tabela 4 - Condições empregadas no teste de estresse	34
Tabela 5 - Peso médio cápsulas de Mansil	35
Tabela 6 - Preparo das soluções para o teste de linearidade	39
Tabela 7 - Preparo das soluções para o teste de recuperação	41
Tabela 8 - Condições empregadas no teste de estresse	45
Tabela 9 - Preparo das soluções para o teste de linearidade	55
Tabela 10 - Preparo das soluções para o teste de recuperação	57
Tabela 11 - Bandas do espectro de absorção da oxamniquina na região do IR	59
Tabela 12 - Resultados obtidos após condições de estresse da solução padrão de trabalho – Oxamniquina e Uk-3883	64
Tabela 13 - Resultados obtidos após condições de estresse da solução amostra comercial	69
Tabela 14 - Oxamniquina: valores de área obtidos - linearidade	74
Tabela 15 - Uk-3883: valores de área obtidos - linearidade	75
Tabela 16 - Resultados de LD e LQ de Oxamniquina e de Uk-3883	76
Tabela 17 - Resultados relativos ao ensaio de precisão	77
Tabela 18 – Resultados obtidos nas determinações de precisão intermediária - CE	77
Tabela 19 - Resultados obtidos na determinação da recuperação do método específico por HPLC	78
Tabela 20 - Resultados obtidos após condições de estresse da solução padrão de trabalho – Oxamniquina e Uk-3883	89
Tabela 21 - Resultados obtidos após condições de estresse da solução amostra comercial Mansil	95
Tabela 22 - Oxamniquina: valores de área obtidos - linearidade	100
Tabela 23 - Uk-3883: valores de área obtidos - linearidade	101
Tabela 24 - Resultados de LD e LQ de Oxamniquina e de Uk-3883	103
Tabela 25 - Resultados relativos às razões do ensaio de precisão - CE	104
Tabela 26 – Resultados obtidos nas determinações de precisão intermediária - CE	104
Tabela 27 - Resultados obtidos na determinação da recuperação do método por CE	105

Tabela 28 – Parametros estatísticos e estudo comparativo entre CE e HPLC para a determinação e quantificação de oxamniquina e uk-3883

LISTA DE ABREVIações

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Eletroforese capilar
CEC	Eletrocromatografia capilar
CGE	Eletroforese capilar em gel
CIEP	Focalização isoelétrica capilar
CITP	Isotacoforese capilar
Cloza	Clozapina
CMC	Concentração micelar crítica
CZE	Eletroforese capilar de zona
FDA	Food drug administration
FEO	Fluxo eletrosmoótico
FM	Fase móvel
FSCE	Eletroforese capilar de solução livre
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEEKC	Cromatografia eletrocinética em microemulsão
MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar
nm	Nanômetros
pH	Potencial hidrogeniônico
t_R	Tempo de retenção
t_M	Tempo de migração
mL	Mililitros
DAD	Detector de arranjo diodo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Oxa	Oxamniquina
p.a.	Princípio ativo

p.i.	Padrão interno
Ref	Referência
Rs	Resolução
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SNC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Uk	Uk-3883
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose, também chamada esquistossomíase ou bilharziose, é uma doença produzida por trematódeos do gênero *Schistosoma*. Dentre as 19 espécies reconhecidas, cinco infectam primariamente o homem: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. mekongi*¹.

O número de pessoas com infecção esquistossomótica, em todo o mundo, foi estimado em 200 milhões. A grande maioria delas vive na Ásia e África. Na América do Sul e Caribe encontram-se vários milhões de casos².

Data de 1907 a confirmação da existência da enfermidade no Brasil, realizada por Pirajá da Silva, e de 1908 a descrição do verme adulto (*Schistosoma mansoni*), única espécie que encontrou condições para adaptação nas Américas. Admite-se existirem mais de seis milhões de casos no País, sendo a endemia observada na faixa litorânea, que compreende desde a região Norte até a região Sul (do Pará ao Paraná)^{2,3}.

Para o tratamento da esquistossomose dois fármacos são amplamente utilizados: o praziquantel que é um fármaco anti-helmintico de amplo espectro, sendo o agente geralmente usado para a erradicação do esquistossomo⁴, e a oxamniquina, agente utilizado quando o praziquantel não apresenta ação desejada⁵.

Embora o *S.mansoni* seja altamente suscetível a oxamniquina, esta é considerada o fármaco de segunda escolha devido a seus efeitos colaterais, principalmente àqueles ligados ao Sistema Nervoso Central (SNC)^{1,6}, como tonteira, cefaleia e sonolência.

O mecanismo de ação da oxamniquina ainda não está completamente elucidado, sendo sugerido por alguns autores que o fármaco é enzimaticamente convertido através de uma quinase ou sulfotransferase para um éster e este alquila o DNA do *Schistosoma*, assim, o grupo metilhidroxil é essencial à atividade biológica^{1,7}.

Todo medicamento produzido hoje deve ter sua qualidade assistida e garantida. Para tanto, é preciso que os laboratórios de pesquisa e as indústrias se comprometam no ideal da produção e distribuição de produtos cada vez mais eficazes e seguros.

Para o acompanhamento da qualidade dos produtos, os estudos de estabilidade tem seu papel de suma importância, pois monitoram o produto desde sua fabricação até o prazo final do produto sendo que, através dos resultados dos estudos de estabilidade, podemos estimar, em curto prazo, como o produto poderá se comportar a longo prazo e, a longo prazo, conseguimos acompanhar mais de perto o comportamento do fármaco e avaliar seu comportamento real, ou seja, o quanto se manteve as características do produto durante o tempo de prateleira e, assim, a possibilidade de aumentar o tempo de validade do mesmo^{8,9,10}.

As diretrizes da RE nº1/2005 e a *International Conference on Harmonisation (ICH)* tem como principal aplicabilidade a determinação do prazo de estabilidade dos produtos farmacêuticos, porém, para chegar a determinação da quantificação dos produtos de degradação e os métodos correspondentes, foi necessária a publicação do Informe Técnico nº 1/2008, com o objetivo de esclarecer procedimentos em que a impureza ou o padrão do produto de degradação não estão disponíveis. Estes procedimentos envolvem a realização de testes de estresse sob condições variadas^{10,11}.

A produção das condições de estresse são descritas nas diretrizes do Informe Técnico nº1/2008 e do ICH que orientam que os produtos farmacêuticos sejam expostos ao aquecimento, a umidade, a contato com solução ácida, solução básica, solução oxidativa e fotolítica, sendo também a possibilidade da exposição a íons metálicos^{10,11}. O teste deve avaliar a susceptibilidade do fármaco a hidrólise numa vasta gama de pH quando em solução ou suspensão¹¹.

É importante reforçar que o objetivo destes testes não é degradar totalmente o composto, mas promover uma degradação de pequena extensão em torno de 10 – 30% (dez a trinta por cento) a fim de auxiliar em sua extração, identificação e possível quantificação¹¹.

Muitos métodos poderão ser usados para o isolamento e caracterização das impurezas. Mas a aplicação de alguns métodos depende da natureza físico-química da impureza, sua estrutura e sua disponibilidade¹².

Agências reguladoras globais requerem identificação de impurezas de baixo nível. A cromatografia líquida acoplada à espectrofotometria de massas (LC-MS) é uma ferramenta poderosa para a caracterização destes compostos^{13,14}. Além desta, outras técnicas são utilizadas para caracterização de estruturas químicas: ressonância magnética nuclear^{15,16} e difração de raio X^{17,18,19}.

A oxamniquina é determinada em formulações farmacêuticas e em amostras biológicas, utilizando-se a cromatografia a gás²⁰, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)^{21,22,23,24,25,26}, espectrofotometria^{27,28,29}, eletroforese capilar (CE)²² e fluorimetria^{29,30}.

Utilizando coluna com fase estacionária quiral (como Quiral-AGP e Cyclobond I ou II), Abushoffa e Clark²⁶, determinaram por HPLC os enantiômeros da oxamniquina no *bulk* e no comprimido. Com detecção a 246 nm em fase móvel constituída de 2-propanol e tampão fosfato de sódio 10 m.mol.L⁻¹ com cloreto de sódio 0.1 m.mol.L⁻¹ (0,5:99,5, v/v). A vazão utilizada nas determinações foi de 1 ml.min⁻¹.

Fell e colaboradores²¹, determinaram por HPLC os enantiômeros de oxamniquina utilizando coluna de fase estacionária quiral (AGP) com fase móvel composta por 2-

propanol e tampão fosfato 10 m.mol.L⁻¹ com cloreto de sódio 0.1 mol/L (99.5:0,5 v/v) 246 nm

Já em 1989, Fell e colaboradores²², determinaram por HPLC os metabolitos de oxamniquina *in vitro* e seus compostos relacionados, utilizando colunas de fase estacionária quiral (α -GP) com fase móvel hexano e 2-propanol (90:10, v/v), vazão de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 246 nm.

Pierri e colaboradores²⁵, determinaram oxamniquina em cápsulas por HPLC através do uso da coluna LiChrospher avaliando os seguintes sistemas de fase móvel: metanol, água e trietanolamina (60:40:0,099 v/v/w) (sistema C); metanol, acetonitrila, água e ácido fórmico (40:30:30:0,083 v/v/w) (sistema D). A vazão avaliada nos sistema foi de 1,2 mL.min⁻¹, com detecção a 260 nm e temperatura de 28 \pm 2 °C²⁶.

Na determinação de oxamniquina em material biológico, Jun e Radwan²⁴, determinaram a oxamniquina em amostras de plasma utilizando uma coluna RP-Phenyl. A fase móvel foi constituída por tampão acetato 0,05 m.mol.L⁻¹ (pH 5,0) e acetonitrila (30:70, v/v) com detecção de 254 nm.

Abushoffa e Clark²⁶, descreveram sua metodologia analítica por CE para a resolução de enantiomeros da oxamniquina no *bulk* e no comprimido. Os autores utilizaram solução tampão de fosfato 50 mmol.L⁻¹ (pH 3.0) + 3 mmol.L⁻¹ de heparina e solução tampão de fosfato mmol.L⁻¹ (pH 12.0) + 25 mmol.L⁻¹ de β -ciclodextrina.

Até o presente, pela revisão de literatura, só encontramos um trabalho utilizando o método de CE para determinação de oxamniquina em formulações farmacêuticas. Portanto, neste trabalho propomos desenvolver e validar um método de eletroforese capilar como técnica complementar à cromatografia líquida de alta eficiência, para a determinação de oxamniquina e sua impureza em formulações farmacêuticas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Schistosoma mansoni* e a esquistossomose

Na classe *Trematoda* encontramos a família *Schistosomatidae*, que apresenta sexos separados e são parasitos de vasos sanguíneos de mamíferos e aves. Essa família é dividida em duas subfamílias: *Bilharziellinae* e *Schistosomatidae*. Na primeira encontramos os vermes sem dimorfismo sexual, que parasitam aves e alguns mamíferos domésticos ou silvestres (patos, gansos, búfalos, bovinos, etc.), portanto, sem interesse médico direto. Na segunda, estão incluídos os que apresentam um nítido dimorfismo sexual e com espécies que parasitam o homem e animais³¹. Bilhars, em 1852 foi o primeiro a descrever um parasita vascular durante uma necropsia em um rapaz, para o qual deu o nome de *Distomum haematobium*. Posteriormente, Weinland, em 1858, denominou o gênero helminto de *Schistosoma*, sendo esta denominação aceita até hoje³².

A denominação da espécie *Schistosoma mansoni* foi dada em 1907, por Sambon. As observações deste autor, que o levaram a criar uma espécie nova, foram independentemente vistas por Pirajá da Silva, na Bahia, na mesma época, que a denominou *Schistosoma americanum*. Os trabalhos de Pirajá da Silva dirimiram todas as dúvidas, mas a denominação da espécie coube a Sambon³².

O ciclo biológico foi descrito primeiramente por Lutz, no Brasil, e por Leiper, no Egito, independentemente. As espécies do gênero *Schistosoma*, que têm importância epidemiológica em medicina humana, são^{2,32}:

- *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852): localiza-se de preferência no plexo vesical e produz quadro clínico com sintomas urinários, conhecido por esquistossomíase hematóbica, esquistossomose (ou bilharziose) vesical, urinária ou

geniturinária. Sua distribuição é predominantemente africana e os moluscos vetores são espécies do gênero *Bulinus*.

- *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904): é responsável por outra modalidade intestinal da doença, que se encontra na Indonésia, na China e nas Filipinas, onde vivem os hospedeiros intermediários adequados, que são diferentes espécies do gênero *Oncomelania*.

- *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907): os parasitas ficam localizados nas vênulas do intestino grosso e, sobretudo, do reto, com sintomas predominantemente intestinais. Nas formas mais graves, há envolvimento hepatoesplênico e hipertensão no sistema porta. A doença é conhecida popularmente por xistossomose, xistosomose, xistosa ou doença do caramujo.

O praziquantel é um fármaco anti-helmíntico de amplo espectro sendo o agente geralmente usado nos programas de larga escala para a erradicação do esquistossomo⁴.

2.2 Oxamniquina

2.2.1 Propriedades físico-químicas³³

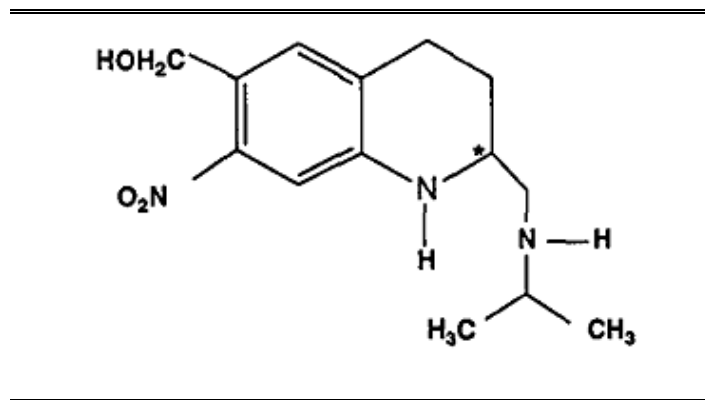


Figura 1. Estrutura química da oxamniquina

A oxamniquina é uma tetraidroquinolina semissintética 1,2,3,4-tetrahydro-2-[(isopropilamino)metil]7-nitro-6-quinolina metanol. Trata-se de um sólido cristalino de coloração amarelo a alaranjado parcialmente solúvel em água, mas solúvel em metanol, acetona e clorofórmio. Seu ponto de fusão é de 147°C a 150°C [1] e a impureza relacionada ao ativo sintetizada é a UK-3883 – 2-isopropilaminometil-6-metil-7-nitro-1,2,3,4-tetrahydroquinolina.

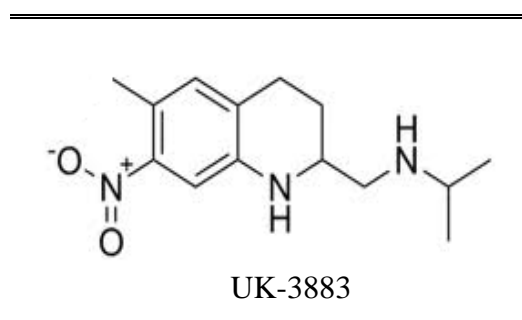


Figura 2. Estrutura química da substância relacionada à oxamniquina

2.2.2 Farmacodinâmica

As ações anti-helmínticas da oxamniquina mostra-se ativa contra os estágios tanto maduro quanto imaturos de *S. mansoni*, mas não parece ser cercaricida. O mecanismo de ação permanece desconhecido. A contração e a paralisia dos vermes resultam em seu desprendimento das vênulas terminais no mesentério e migração para o fígado, onde muitos deles morrem; as fêmeas que sobrevivem retornam aos vasos mesentéricos, porém cessam de por ovos⁵.

Os pacientes não curados apresentam uma redução na eliminação de ovos, nas fezes, da ordem de 80 a 90%. A oxamniquina tem dado bons resultados mesmo nos casos crônicos avançados, com hepatosplenomegalia, e nos casos de polipose do cólon. A droga é ineficaz contra *S. haematobium*, *S. japonicum* e alguns outros esquistossomos de animais².

2.2.3 Farmacocinética

Facilmente absorvida por via oral, a oxamniquina tem meia vida plasmática de até 2,5 horas. O fármaco é extensamente metabolizado em metabolitos ácido inativos e eliminado por via renal em até 75% nas primeiras 24 horas (a urina pode adquirir coloração vermelho-alaranjado, por isso)^{4,5}.

As cepas de *S. mansoni* em diferentes partes do mundo variam na sua suscetibilidade. A oxamniquina tem sido eficaz em casos de resistência ao praziquantel. Nas infecções mistas de *S. haematobium* e *S. mansoni*, o metrifonato foi associado a oxamniquina, com resultados bem sucedidos⁵.

2.2.4 Efeitos adversos e contraindicações

Em mais de um terço dos pacientes ocorre sintomas leves, que surgem cerca de 3 horas após uma dose e persistem por varias horas. Os sintomas do sistema nervoso central (tonteira, cefaleia, sonolência) são mais comuns. Verifica-se também a ocorrência de náusea, vômitos, diarreia, cólica, prurido e urticaria. Os efeitos adversos infrequentes consistem em febre baixa, pigmentação laranja a vermelha na urina, proteinúria, hematúria microscópica e redução transitória dos leucócitos. Raramente, foi relatada ocorrência de convulsões⁵.

Como a oxamniquina provoca tonteira ou sonolência em muitos pacientes, deve ser utilizada com cautela naqueles cujo trabalho ou atividade exige um estado de alerta mental (por exemplo, não se deve dirigir veículos motorizados durante 24 horas). Deve ser utilizada com cautela em indivíduos com histórico de epilepsia e é contraindicada durante a gravidez⁵ e lactação e a pacientes que apresentam hipersensibilidade a oxamniquina ou a qualquer outro componente da fórmula.

2.2.5 Administração

A dose efetiva depende da origem da infecção. Sugere-se uma dose única de 15 mg/kg para adultos que adquirem a infecção na América do Sul, nas ilhas do Caribe e no oeste da África; para crianças destas áreas, duas doses de 10 mg/kg, a um intervalo de 3 a 8 horas. No leste e no centro da África e na península arábica, é necessário administrar 15 mg/kg duas vezes em 1 dia. Esta dose deve ser aumentada para 20 mg/kg duas vezes em 1 dia na Etiópia, no Zaire e a oeste do Nilo. Em outras regiões do Egito, no Sudão e na África do Sul, recomenda-se o uso de 20 mg/kg/dia durante 3

dias. Foram descritas convulsões generalizadas após o uso desta droga, mas estas parecem ser raras^{2,5}.

Os pacientes devem ser advertidos de que durante o tratamento com oxamniquina pode ocorrer sonolência e tontura. Deve-se ter cautela ao dirigir e operar máquinas durante o uso deste medicamento³³.

2.3 Métodos Indicativos de Estabilidade

Os métodos indicativos de estabilidade são utilizados para a análise de estabilidade de amostras na indústria farmacêutica. Para a sua realização é necessário seguir três etapas^{60,61}:

1. A geração da amostra, onde a molécula será estressada para forçar a degradação;
2. O desenvolvimento da metodologia indicativa de estabilidade;
3. A validação do método indicativo de estabilidade.

2.3.1 Geração da Amostra

O teste de degradação forçada ou estresse é realizado para demonstrar a especificidade no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, principalmente quando há pouca informação disponível sobre potenciais produtos de degradação. Estes estudos também fornecem informações sobre as vias de degradação e produtos de degradação que poderiam se formar durante o armazenamento. Estudos de degradação forçada podem ajudar a facilitar o desenvolvimento farmacêutico, tais como em áreas de desenvolvimento de formulação, fabricação e embalagem, em que o conhecimento do comportamento químico podem ser usados para melhorar um medicamento⁶².

Estudos de degradação forçada devem ser realizados sempre que um estudo indicativo de estabilidade for requerido e devem ser realizadas em cada formulação única antes do início dos estudos formais de estabilidade.

Segundo a RDC nº58 de 20 de dezembro de 2013 o estudo de degradação forçada deve ser conduzido em um lote, em escala laboratorial, piloto ou industrial do medicamento e para fins de comparação a execução do estudo deve ser feita também com a formulação, com o placebo e no insumo farmacêutico ativo isolado e associado no caso de associações em dose fixa. Além disso, o estudo de degradação deve ser realizado em todas as concentrações do medicamento⁶³.

O estudo de degradação forçada deve submeter a amostra as seguintes condições: aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica e íons metálicos⁶³.

2.3.1.1 Degradação Térmica

A análise térmica possibilita uma ampla faixa de aplicação para medidas de propriedades físicas como: estudo de reações químicas, avaliação de estabilidade térmica, determinação da composição de materiais e desenvolvimento de metodologia analítica. Essas medidas são avaliadas no desenvolvimento de formulações e verificadas nos estudos de estabilidade, possibilitando a escolha das formulações mais estáveis⁶⁴.

A termoanálise é uma ferramenta útil para avaliar rapidamente uma possível interação entre os componentes ativos e os excipientes em estudos de compatibilidade na pré-formulação, avaliação da existência de polimorfismo, compostos de inclusão e

dispersão de sólidos, determinação de pureza química, estudos de reações no estado sólido, análise de formas farmacêuticas e controle de qualidade^{65,66}.

2.3.1.2 Hidrólise neutra, ácida ou básica

A água é considerada um dos principais catalisadores em reações de degradação. Muitos fármacos são considerados como instáveis nesse meio e necessitam de intervenções durante a formulação e armazenamento, para que sua eficácia e estabilidade, na forma farmacêutica final, não sejam comprometidas. Para a avaliação da instabilidade sob a condição de hidrólise, também deve ser levado em consideração o pH do meio, pois os íons de hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação⁶⁷.

Para realizar o estudo de estresse em condição de hidrólise ácida, utiliza-se principalmente ácido clorídrico e para a hidrólise básica, hidróxido de sódio, sendo que algumas variações são observadas no tempo e temperatura de exposição dos fármacos para essa condição⁶⁸.

2.3.1.3 Oxidação

A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade de fármacos. A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo ou radical. Muitas oxidações são reações em cadeia, que ocorrem lentamente sob a influência do oxigênio molecular; esse processo é referido como auto-oxidação⁶⁹.

O peróxido de hidrogênio é utilizado para produzir as condições de estresse empregadas para o estudo de degradação. A concentração do peróxido utilizada varia de 1% a 30%.

2.3.1.4 Degradação por fotólise

A reação por fotólise é iniciada após a absorção de radiação eletromagnética. A maioria dos princípios ativos empregados na preparação de medicamentos apresenta máximos de absorção na região do ultravioleta do espectro eletromagnético. A radiação ultravioleta é muito energética e pode a clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo a degradação da molécula. Assim, é importante conhecer a fotoestabilidade dos fármacos utilizadas como medicamentos e os produtos formados devido à fotólise, além de avaliar a toxicidade destes últimos⁷⁰.

Os fármacos podem sofrer exposição a comprimentos de onda curtas ou longas dentro da faixa de UV, ou luz fluorescente de iluminação que varia de 400-1580 *foot candles*, sob temperatura ambiente. Os estudos de fotoestabilidade são feitos na forma sólida ou em solução⁶⁸.

2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência é de grande valia na análise de fármacos em medicamentos. Trata-se de uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária sólida, contida em uma coluna cilíndrica. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. A técnica permite identificar, quantificar e separar mistura de fármacos dos excipientes e/ou dos produtos de decomposição. Devido a estas características a HPLC tem sido empregada no controle de qualidade de medicamentos e é muito recomendada em compêndios oficiais como a Farmacopéia Brasileira⁹ e a Farmacopéia Americana^{35,36}.

O método de desenvolvimento geralmente usado em HPLC é a diluição. Antes de injetar a amostra, a fase móvel é bombeada sob alta pressão a uma vazão controlada até obter uma linha de base estável.

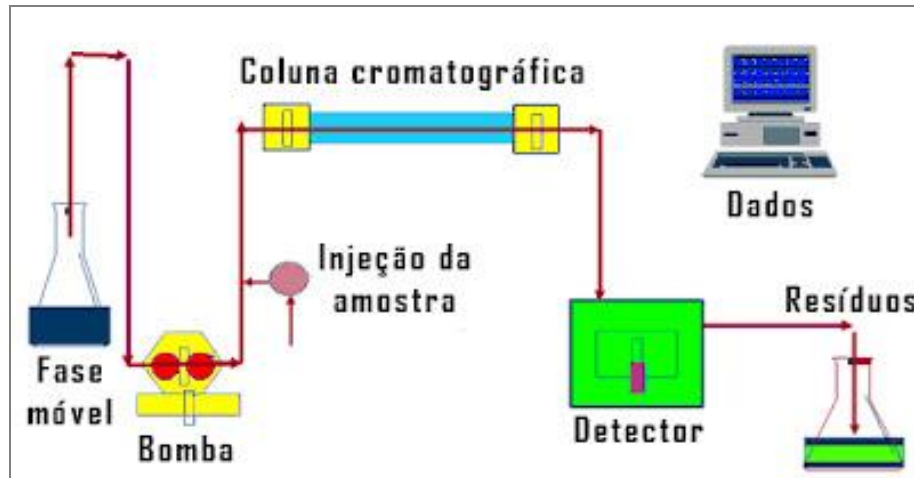


Figura 3. Esquema básico da cromatografia a líquido de alta eficiência³⁸.

2.5 Eletroforese capilar (CE)

Na última década, a eletroforese capilar vem sendo apontada como uma alternativa bastante atraente para a determinação simultânea de ânions⁴⁰. A eletroforese capilar é uma técnica de alta eficiência de separação extremamente útil, pois envolve a separação eletroforética de pequenas quantidades de moléculas em solução de acordo com suas diferentes velocidades em um campo elétrico aplicado. A velocidade destas moléculas na solução é diretamente proporcional à sua carga e, portanto, as moléculas positivamente carregadas são detectadas primeiro. Eletroforese capilar é capaz de separar e quantificar cátions, ânions e moléculas, sem carga simultaneamente, após a injeção de volumes bastante reduzidos de amostra (1 a 10 nL), que são cerca de 1000 vezes menor que o volume de amostra normalmente

trabalhado em HPLC. O processo de separação ocorre em um capilar de sílica fundida, tipicamente 25-75 μm de diâmetro interno por 100 cm de comprimento total. As amostras são introduzidas no capilar por injeção hidrodinâmica ou eletrocinética. O capilar é preenchido com a solução tampão e cada extremidade do capilar é imerso em recipientes que contêm a mesma solução tampão junto com os eletrodos. A separação ocorre pela geração de um campo elétrico (eletroforese) aplicado. A taxa de migração dos componentes da amostra depende do pH do tampão e da voltagem aplicada. A Eletroforese Capilar emprega uma alta tensão (05-30 kV) para induzir o transporte eletroforético e separação dos componentes da amostra. A combinação de eletroforese e eletro-osmose leva a amostra através do tubo capilar para os sistemas detector. A absorvância UV, fluorescência, e detectores de espectrometria de massa são utilizados em sistemas de eletroforese capilar (Figura 3)^{40,41,42,43}.

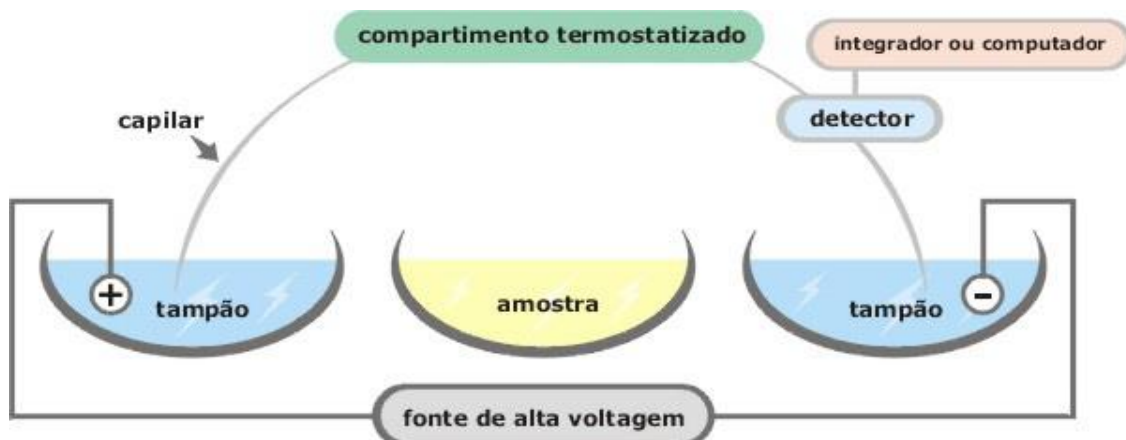


Figura 4. Esquema básico do sistema de eletroforese capilar⁴³.

2.5.1 Classificação da eletroforese capilar

Os principais modos da eletroforese capilar incluem a eletroforese capilar de zona (CZE), a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), a cromatografia eletrocinética por

microemulsão (MEEKC), a eletroforese capilar em gel (CGE), a focalização isoeletrica capilar (CIEP), a isotacoforese capilar (CITP) e a eletrocromatografia capilar (CEC)⁴⁴.

2.5.1.1 Eletroforese capilar de zona (CZE)

Na eletroforese capilar de zona, a composição do tampão é constante na região da separação. O campo elétrico criado influencia os diferentes compostos iônicos da mistura a migrarem pelo capilar até o detector de acordo com suas próprias mobilidades e a se separem em zonas que podem ser completamente resolvidas ou apresentar sobreposição parcial^{45,46}.

2.5.1.2 Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

As condições de separação envolvem o uso de eletrólitos contendo níveis relativamente altos de tensoativos, tal como dodecilssulfato de sódio (SDS). Acima de uma determinada concentração, denominada de concentração micelar crítica (CMC), as moléculas do tensoativo começam a agregar-se, formando micelas. A separação é baseada na partição das moléculas entre a fase micelar (pseudo-fase estacionária) e o tampão aquoso. As micelas de SDS têm carga negativa e migram contra o fluxo eletrosmótico (FEO) que tem força suficiente para forçar as micelas a passarem pelo detector. Espécies carregadas positivamente são retardadas pela associação com micelas carregadas negativamente, moléculas neutras têm uma partição entre as fases micelar e aquosa do tampão e têm uma mobilidade intermediária, enquanto que moléculas carregadas negativamente são repelidas pelas micelas. As separações são conduzidas em pH onde há um FEO apreciável^{46,47}.

Podemos adicionar solventes orgânicos e reagentes par-iônicos no tampão para melhorar a retenção e a seletividade das moléculas. MECK é um modo especialmente

útil para a resolução de solutos neutros insolúveis em água, como por exemplo os esteroides^{46,47}.

2.5.1.3 Cromatografia eletrocinética microemulsão (MEEKC)

Na cromatografia electrocinético microemulsão (MEEKC) o meio de separação é constituída por uma emulsão em escala micrométrica baseado em gotículas de óleo (tais como solventes hidrófobicos de n-octano e outros) suspensas em tampão aquoso. Microemulsões são estabilizadas pela presença em de um agente tensoativo e de um co-agente tensoativo, o qual é um álcool de cadeia curta como o butanol⁴⁸.

2.5.1.4 Eletroforese capilar em gel (CGE)

A separação de biomoléculas grandes, tais como DNA, por eletroforese capilar de solução (FSCE), às vezes é muito difícil de obter devido à similaridade nas razões massa/carga. Assim FSCE muitas vezes não é suficiente para separar estes tipos de substâncias. Uma alternativa é preencher o capilar com um gel, onde o principal mecanismo de separação está baseado nas diferenças dos tamanhos dos solutos que migram através dos poros do polímero⁴⁷.

Íons menores migram mais rapidamente enquanto que solutos maiores ficam mais tempo retidos. Além disso, o gel serve como um meio anticonvectivo, minimizando a difusão dos solutos. Ele também previne a adsorção do soluto nas paredes do capilar e ajuda a eliminar a eletroosmose. Entretanto, o gel deve possuir certas características, tais como, ser estável termicamente e ter uma faixa de tamanho de poros apropriada (dependendo das massas molares dos solutos da amostra), para poder ser um meio eletroforético adequado. Esta técnica está sujeita à limitação de que espécies neutras não migram através do gel, uma vez que o FEO é suprimido⁴³.

2.5.1.5 Focalização isoelétrica capilar (CIEP)

A aplicação de um campo elétrico na mistura de anfólitos gera a formação de um gradiente de pH. Os anfólitos são mantidos em um meio onde se usa um cátodo com pH alto, tipicamente hidróxido de sódio e um ânodo com pH baixo, tipicamente ácido fosfórico. As proteínas, que são anfóteras, irão se comportar de maneira idêntica e serão focalizadas em uma dada posição ditada pelo seu ponto isoelétrico (PI)⁴³.

2.5.1.6 Isotacoforese capilar (CITP)

Trata-se de uma técnica de fronteira móvel onde a amostra é analisada por dois tampões diferentes ao mesmo tempo. A solução tampão localizada na entrada do sistema é diferente da localizada na saída. Com a aplicação do campo elétrico ocorre a separação e migração dos componentes. Ânions e cátions não são usualmente separados na mesma corrida⁴⁶.

2.5.1.7 Eletrocromatografia capilar (CEC)

Eletrocromatografia capilar é um método de separação baseado em CZE e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), associando a eletromigração de íons com o compartimento entre as fases, típico da cromatografia. No lugar da bomba de pressão, é a fonte de alimento de alta tensão da CE que gera o fluxo através do leito de enchimento do capilar preenchido ou recoberto com fase estacionária de partículas com diâmetro muito pequeno (1-3 μm)^{49,50}. O tempo de retenção é determinado pela combinação da migração eletroforética e da retenção cromatográfica⁵⁰.

2.5.2 Vantagens e limitações da CE

A eletroforese capilar apresenta as seguintes vantagens^{46,47,51}:

- análises rápidas com resultados obtidos em minutos;

- separação de alta eficiência e resolução;
- consumo mínimo de amostras (na ordem de nanolitros – 1 a 20 nL), reagentes e solventes;
- utiliza colunas capilares duradouras, que podem ser usadas para separação e análise de compostos polares, compostos não-polares, compostos quirálicos e biomoléculas de alta massa molecular;
- versatilidade analítica devido a fatores instrumentais que ajustados melhoram a metodologia aplicada: voltagem, temperatura, modo de introdução da amostra, modo de análise (por fluxo eletrosmótico, por pressão, por vácuo).

A desvantagem da CE é a falta de injetores de volume fixo para a injeção da amostra, o que pode prejudicar a precisão da injeção da amostra, o que pode ser amenizado pela utilização de um padrão interno e altas concentrações da amostra.

2.6 Validação de Metodologia analítica

A validação de métodos analíticos é um processo pelo qual se empregam estudos estatísticos para garantir que o método em questão atenda as exigências desejadas, fornecendo uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado⁵².

De modo geral um método analítico deve, idealmente, ser exato para fornecer valor real; ser preciso para fornecer, com o menor número de ensaios, este valor real; ser seletivo para que a exatidão não se desvie com interferentes potenciais; ser sensível ou capaz de detectar as menores concentrações possíveis; e, enfim, responder de forma proporcionalmente linear, ao longo de ampla faixa de concentração. Esses são os cinco atributos mais desejados em um método analítico, a base de um

procedimento de validação: exatidão, precisão, seletividade, sensibilidade e linearidade⁵².

Para a validação de metodologia, a ANVISA, o ICH e as Farmacopeias Brasileira e Americana exigem mais alguns parâmetros a serem avaliados durante os ensaios da metodologia: limite de detecção (LD); limite de quantificação (LQ); intervalo e robustez³⁶.

A ANVISA, através da RE nº899 de 29 de maio de 2003, define o objetivo da validação como “demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-qualitativa e/ou quantitativa de fármaco e outras substâncias em produtos farmacêuticos”³⁸.

A palavra validação originou-se do latim *validus* que significa forte e sugere que algo deve ser provado que é verdadeiro e útil, sendo assim aceito como padrão⁷². Consiste em estabelecer evidência documentada, que proporcione com alto grau de segurança, de que determinado procedimento quando executado sob condições pré-estudadas e definidas seja capaz de reproduzir um serviço ou bem dentro das especificações e atributos de qualidade desejáveis.

“A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das publicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”³⁸

Durante a validação de métodos analíticos e processos a área farmacêutica utiliza algumas guias publicadas pelas principais associações de química analítica e agências reguladoras: *Association of Official Analytical Chemists (AOAC), United States na Drug Administration (FDA), Organização Mundial da Saúde (OMS), International Organization for Standardization (ISO), International Union of Pure and Applied Chemistry*

(IUPAC), *United States Pharmacopeia* (USP) e no Brasil, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial⁷².

As definições de validação estão constantemente em evolução e atualização por parte das agências reguladoras vigentes⁷¹.

Dentre diversas definições o *International Conference on harmonization* (ICH, 2005) foi o resultado de uma conferência realizada por representantes de indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão, na tentativa de harmonizar todas as definições, parâmetros, requerimentos para metodologias analíticas com aplicações farmacêuticas. Com essa base, cada país tem sua legislação e procedimentos⁷¹.

2.6.1 Parâmetros de validação

Cada método analítico possui suas variações e determinantes, principalmente devido às diferentes necessidades de cada caso. Por esses motivos, a USP, no ***General Chapter <1225>***, dividiu os parâmetros em quatro categorias divididas entre os propósitos da validação, sendo³⁸:

- **Categoria I:** Procedimento para quantificação de fármacos, excipientes ou ingredientes ativos (incluindo conservantes) em produtos farmacêuticos;
- **Categoria II:** Procedimento para a determinação de impurezas, incluindo os ensaios quantitativos e testes limites;
- **Categoria III:** Procedimentos analíticos para determinação de desempenho de ensaio como dissolução, desintegração, etc.;
- **Categoria IV:** Testes de identificação.

Tabela 1 - Parâmetros necessários durante a validação de método ³⁸

Parâmetros analítico	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativa	Teste limite		
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Limite de detecção (LD)	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação (LQ)	Não	Sim	Não	*	Não
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Curva analítica	Sim	Sim	*	*	Não

*Ensaio que pode ser requerido, dependendo da natureza do teste de especificidade/seletividade.

2.6.2 Definição dos parâmetros de validação

2.6.2.1 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado³⁸.

Segundo a RE nº899, de 29 de maio de 2003, recomenda-se que o ensaio de linearidade seja determinado pela avaliação de, no mínimo, 5 concentrações diferentes, conforme o quadro a seguir:

Tabela 2 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para métodos analíticos²⁸

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível da impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas.

2.6.2.2 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma amostra.

Para a determinação de precisão os guias de validação recomendam três ensaios distintos: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade:

- **Repetibilidade (precisão intra-corrída):** concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação;
- **Precisão intermediária (precisão inter-corrídas):** concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes (recomenda-se o mínimo de 2 dias de diferença), com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes;
- **Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial):** concordância entre os resultados obtidos em diferentes laboratórios, como em estudos colaborativos.
- Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão do registro.

2.6.2.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em um estudo em relação ao valor verdadeiro³⁸

A exatidão pode ser avaliada das seguintes maneiras:

A) Fármaco isolado

Aplicação de metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência);

Comparação dos resultados obtidos pela metodologia proposta, com aqueles resultantes de uma metodologia bem caracterizada, cuja exatidão já tenha sido estabelecida;

B) Forma farmacêutica

Na análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado);

Nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão disponíveis, se aceita para avaliação da exatidão, a análise pelo método de adição do padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento;

C) Impurezas

Análise pelo método de adição do padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco isolado;

No caso de indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, se aceita a comparação dos resultados obtidos com um segundo método

bem caracterizado (metodologia farmacopêica ou outro procedimento analítico validado);

A exatidão é determinada a partir do seguinte cálculo:

$$\frac{CME}{CT} \times 100\% = \text{Exatidão}$$

Onde:

CME – Concentração Média Experimental;

CT – Concentração teórica;

2.6.2.4 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, o que o confere confiança durante seu uso em rotinas³⁸.

Durante a validação de métodos analíticos, pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), exemplos dos fatores a serem avaliados estão descritos no quadro a seguir:

Tabela 3 - Exemplos de fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico³⁸

Fatores	Exemplo de fatores a serem avaliados
Preparo de amostras	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidade das soluções analíticas • Tempo de extração
Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	<ul style="list-style-type: none"> • Variação de pH da fase móvel • Variação na composição da fase móvel • Diferentes lotes ou fabricantes de colunas • Temperatura • Fluxo de fase móvel

2.6.2.5 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectado³⁸.

2.6.2.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de um analito que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão, sob as condições experimentais definidas. Geralmente, esse teste é utilizado para determinação de impurezas ou produtos de degradação em uma matriz³⁸.

O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra³⁸.

2.6.2.7 Especificidade e seletividade

A seletividade é o teste realizado com o placebo para a avaliação da presença do analito, impurezas, produtos de degradação, etc. presentes na matriz da amostra, que possam interferir no resultado final do analito em questão, garantindo que a resposta seja, exclusivamente, a do composto de interesse. ICH 2008

Há diversos procedimentos para a determinação da seletividade, sendo uma delas a comparação da matriz isenta de substância de interesse (placebo), com a matriz adicionada de padrão de interesse, sendo neste caso que não deve apresentar

interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção que o analito de interesse, bem como se apresentar separada dos demais compostos presentes na amostra⁷¹.

Para análise quantitativa (doseamento) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostra (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão de produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado. Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse tais como: luz, calor, umidade, hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação³⁸.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência e por eletroforese capilar para quantificar a oxamniquina em formulações comerciais.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento dos métodos HPLC, e CE para quantificar a oxamniquina em formulações farmacêuticas;
- Validação das metodologias analíticas desenvolvidas segundo critérios da ANVISA, Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia dos Estados Unidos da América (USP) e *International Conference on Harmonization* (ICH) com respeito a especificidade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez;
- Aplicação dos métodos validados às amostras comerciais para quantificação da oxamniquina;
- Comparação estatística das metodologias analíticas utilizadas pelos testes estatísticos *t*, *F* e análise de variância (ANOVA).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1. Reagentes, solventes e soluções

- Acetonitrila, grau cromatográfico (J. T. Baker[®]);
- Ácido clorídrico, p.a. (Merck[®]);
- Ácido orto-fosfórico, p. a. (Merck[®]);
- Água ultrapurificada através do sistema Direct-Q[®] 3 UV (Millipore[®]);
- Fosfato de sódio monobásico, p. a. (Sigma-Aldrich[®]);
- Hidróxido de sódio, p.a. (Merck[®]);
- Metanol, grau cromatográfico (J. T. Baker[®]);
- Peróxido de hidrogênio, p.a. (Merck[®])

4.1.2. Substâncias empregadas como padrão

Padrão oxamniquina, 99,7% de pureza (Pfizer)

Padrão de substâncias relacionadas:

- UK-3883 (2-isopropilaminometil-6-metil-7-nitro-1,2,3,4-tetrahydroquinolina)
99,5% (Pfizer);

4.1.3. Substâncias empregadas como candidatas a padrão interno

- Atenolol (Sigma-Aldrich);
- Cefalexina (Sigma-Aldrich);
- Clozapina (Cristália);

4.1.4. Amostra comercial, Simulada e Placebo

- Mansil[®] cápsulas 250 mg, Lote: 10442001(Pfizer)
- Excipientes da formulação: lactose, amido de milho, estearato de magnésio, laurilsulfato de sódio.

4.2.5 Equipamentos

- Aparelho de ponto de fusão Stuart Scientific modelo SMP1
- Aparelho de Ultra-Purificação de água MilliQ-plus, Millipore[®].
- Balança analítica Mettler modelo AB204;
- Coluna: Thermo Nucleosil[®] C18 (150mm x 4.6mm x 5 μ) ;
- Colunas capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, USA) com diâmetro interno de 50 μ m e comprimento total de 30.2 cm a 50,2 cm;
- Equipamento de eletroforese capilar Beckman and Coulter P/ACE MDQ equipado com detector UV-VIS com arranjo de diodos, que permite a obtenção de espectro UV-VIS em tempo real de cada pico, controlador de temperatura e software Karat[®] V.8.0 para aquisição e tratamento de dados;
- Sistema Cromatográfico Thermo modelo Ultimate 3000 composto por injetor automático, bomba quaternária, degaseificador e detector de arranjo de diodos (DAD);
- Unidades filtrantes FG Millex em polietileno com membrana PTFE 0,45 μ m de poro (Millipore[®])

4.3.5 Método de identificação da oxamniquina

Faixa de fusão: a amostra de oxamniquina foi colocada em um tubo capilar de vidro com uma das extremidades selada até cerca de 3,0 mm de altura em aparelho

convencional de ponto de fusão. Começou-se a aquecer a uma razão de 5°C/min; quando a temperatura chegou a 10°C abaixo do início de fusão teórico da amostra, reduziu-se a velocidade de aquecimento a cerca de 1°C/min. A temperatura na qual a amostra funde sobre a parede do tubo é definida como o início da fusão e a temperatura na qual a amostra torna-se completamente líquida é definida como o final de fusão ou o ponto de fusão [24].

Espectrofotometria no ultravioleta (UV): a identificação espectrofotométrica foi realizada mediante a espectroscopia no ultravioleta, realizando varredura de 190 a 600 nm. O espectro de absorção foi obtido mediante preparo de uma solução de oxamniquina na concentração de 5,0 µg.mL⁻¹ em metanol.

Espectrometria de absorção na região do infravermelho (IR): o padrão foi disperso em pastilhas de brometo de potássio. Foi traçado espectro de IR da substância de trabalho na faixa de 2000 a 400 cm⁻¹, por refletância atenuada.

4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para o desenvolvimento de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizado levantamento bibliográfico relacionado a oxamniquina e para delineamento dos testes conduzidos na bancada a fim de definir as melhores condições para trabalhar com o fármaco e seus subprodutos.

As propriedades físico-químicas de cada fármaco foram avaliadas para a escolha da coluna mais adequada e dos componentes da fase móvel, assim como os ajustes necessários dos parâmetros variáveis utilizados no equipamento, como detector, fluxo, temperatura, injeção da amostra.

4.4.1 Preparo do cromatógrafo líquido

Para o desenvolvimento da metodologia proposta foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), modelo 1100, fabricante Hewlett Packard® fornecedor Agilent Technologies®.

Foram testados os sistemas descritos na tabela XX para avaliação da fase móvel mais adequada na separação da oxamniquina e sua impureza.

4.4.2 Preparo das soluções padrão e de trabalho

-Solução padrão estoque de oxamniquina: foram transferidos 10,0 mg de padrão de oxamniquina para um balão volumétrico de 10 mL e solubilizado com metanol completando o volume com o mesmo solvente (concentração final de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$);

-Solução padrão de trabalho de oxamniquina: foram transferidos 200 μL da solução padrão estoque de oxamniquina para um balão volumétrico de 2 mL; logo depois foram adicionados 200 μL de água ultrapura e 600 μL de metanol (concentração final de 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$);

-Solução padrão estoque da impureza uk-3883: foram transferidos 10,0 mg de padrão da impureza uk-3883 para um balão volumétrico de 10 mL e solubilizado com metanol completando o volume com o mesmo solvente (concentração final de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$);

-Solução padrão de trabalho da impureza uk-3883: foram transferidos 200 μL da solução padrão estoque da impureza uk-3883 para um balão volumétrico de 2 mL; logo

depois foram adicionados 200 μL de água ultrapura e 600 μL de metanol (concentração final de 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$);

Todas as soluções foram sonicadas por 6 minutos para ajudar a dissolução e logo filtradas utilizando filtro de 0,45 μm (Millex).

A validação foi realizada segundo os parâmetros e critérios propostos pela ANVISA, Farmacopéia Americana e *International Conference on Harmonization* (ICH).

4.4.3 Especificidade ou seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente o composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz³⁸.

Para determinar a especificidade do método foram realizados testes de estresse no padrão, no placebo e nas amostras comerciais. Um dos principais objetivos a serem atingidos por meio deste teste é demonstrar que a metodologia aplicada é específica ao fármaco e aos possíveis subprodutos que possam ser desenvolvidos durante o estudo de estresse.

Na **Tabela 4** são demonstradas as condições utilizadas no teste de estresse.

Tabela 4 - Condições empregadas no teste de estresse

Condições de estresse		Exposição	Duração (horas)
Hidrólise ácida	HCl mol L ⁻¹	80°C	Até 48h
Hidrólise básica	NaOH mol L ⁻¹	80°C	Até 48h
Hidrólise neutra	H ₂ O	80°C	Até 48h
Oxidação	H ₂ O ₂	--	Até 48h
Térmica	--	60°C	7 dias
Fotólise			60

Preparou-se uma solução estoque do padrão de oxamniquina em balão volumétrico de 50 mL: foram pesados 50,0 mg de padrão de oxamniquina e transferidos para o balão. Foram adicionados 20,0 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. Após observação da total dissolução do padrão, deixou-se a solução descansar por 10 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo concentração final de 1.000 µg mL⁻¹ de oxamniquina. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos.

Preparou-se uma solução estoque do padrão de Uk-3883 em balão volumétrico de 50 mL: foram pesados 50,0 mg de padrão de Uk-3883 e transferidos para o balão. Foram adicionados 20,0 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. Após observação da total dissolução do padrão, deixou-se a solução descansar por 10 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo concentração final de 1.000 µg mL⁻¹ de Uk-3883. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos.

Para a solução estoque da amostra comercial foi pesado o conteúdo de 10 cápsulas de Mansil de 250mg, obtendo-se o volume médio conforme a tabela abaixo:

Tabela 5 - Peso médio cápsulas de Mansil

Cápsula	Peso (mg)	Cápsula	Peso (mg)
1	340,2	6	340,3
2	340,4	7	340,2
3	340,4	8	340,3
4	340,5	9	340,6
5	340,6	10	340,5
Peso médio		340,4	

Em balão volumétrico de 50 mL foram pesados 170,2 mg do conteúdo da cápsula de Mansil e transferidos para o balão. Foram adicionados 20,0 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. O tempo no banho de ultrassom foi o mesmo observado para a dissolução dos padrões de oxamniquina e do uk-3883 incluindo o tempo de descanso de 10 minutos seguidos pela complementação do volume com o mesmo solvente chegando a uma concentração teórica de $1.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos.

Preparou-se uma solução estoque do placebo em balão volumétrico de 50 mL: foram pesados 170,2 mg do placebo (equivalente ao peso de uma cápsula de Mansil de 250mg) e transferidos para o balão. Foram adicionados 20,0 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. O tempo no banho de ultrassom foi o mesmo observado para a dissolução dos padrões de oxamniquina e do uk-3883 incluindo o tempo de descanso de 10 minutos seguidos pela complementação do volume com o mesmo solvente. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos.

4.4.3.1 Hidrólise ácida

Transferiu-se alíquotas de 1,0 mL da solução padrão estoque de oxamniquina, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida adicionou-se 1,0 mL de ácido clorídrico 1M. Os balões foram levados a banho-maria em temperatura controlada de 80°C. Após os tempos indicados, foi retirado um balão do banho-maria, esperado 10 minutos para que o frasco chegasse a temperatura ambiente e adicionados 1,0 mL de hidróxido de sódio 1M para neutralizar a solução. Após, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e transferida para vial de HPLC para injeção.

4.4.3.2 Hidrólise básica

Transferiu-se alíquotas de 1,0 mL da solução padrão de oxamniquina, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida adicionou-se 1,0 mL de hidróxido de sódio 1M. Os balões foram levados a banho maria em temperatura controlada de 80°C. Após os tempos indicados, foi retirado um balão do banho maria, esperado 10 minutos para que o frasco chegasse a temperatura ambiente e adicionados 1,0 mL de ácido clorídrico 1M para neutralizar a solução. Após, o volume do balão foi completado com metanol 80%. A solução foi filtrada e transferida para vial de HPLC para injeção.

4.4.3.3 Hidrólise oxidativa

Transferiu-se alíquotas de 1,0 mL da solução padrão de oxamniquina, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida

adicionou-se 1,0 mL de H₂O₂ 3%. Após os tempos indicados o volume do balão foi completado com metanol 80%. A solução foi filtrada e transferida para vial de HPLC para injeção.

4.4.3.4 Hidrólise neutra

Transferiu-se alíquotas de 1,0 mL da solução padrão de oxamniquina, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida adicionou-se 1,0 mL de água ultrapura. Após os tempos indicados, foi retirado um balão do banho maria, esperado 10 minutos para que o frasco chegasse a temperatura ambiente e o volume do balão foi completado com metanol 80%. A solução foi filtrada e transferida para vial de HPLC para injeção.

4.4.3.5 Fotólise

Foram pesados 50 mg de padrão de oxamniquina em vidro de relógio. O vidro de relógio foi exposto à condição ICH: opção 2, por 60 horas, sob temperatura de 25±0,5°C. Manteve-se o controle protegido da luz com papel alumínio pelo mesmo período.

Preparou-se uma solução padrão de oxamniquina em balão volumétrico de 10 mL: foram pesados 10,0 mg de padrão de oxamniquina e transferidos para o balão. Foram adicionados 5,0 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. Após observação da total dissolução do padrão, deixou-se a solução descansar por 10 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo concentração final de 1.000 µm mL⁻¹ de oxamniquina. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos. Após 10 minutos de descanso da solução, foi transferida uma alíquota de 0,5 mL para um balão de 5 mL e completado ao volume com metanol

80%. A solução foi para banho de ultrassom por 5 minutos e após, foi filtrada e transferida para vial de HPLC para injeção

4.4.3.6 Térmica

Foram pesados 50 mg de padrão do oxamniquina em placa de petri. A placa de petri foi exposta ao calor de 60°C por 7 dias na estufa. Após a exposição, uma massa de 10,0 mg de padrão de oxamniquina foi pesada e transferida para o balão volumétrico de 5,0 mL. Foram adicionados aproximadamente 3 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. Após observação da total dissolução do padrão, deixou-se a solução descansar por 10 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo concentração final de $2.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de oxamniquina. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos. Após 10 minutos de descanso da solução, foi transferida uma alíquota de 0,5 mL para um balão de 5 mL e completado ao volume com metanol 80%. A solução foi para banho de ultrassom por 5 minutos, após, foi filtrada e transferida para vial de HPLC para injeção

4.4.4 Linearidade

De acordo com a Resolução nº899, linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico.

Para calcular a linearidade foram tomadas alíquotas no intervalo de concentração de 80,0 a 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução padrão estoque de oxamniquina, conforme tabela:

As curvas analíticas foram construídas a partir dos resultados das áreas dos picos obtidos dessas injeções versus as concentrações trabalhadas.

Tabela 6 - Preparo das soluções para o teste de linearidade

Concentração (%)		Volume da Solução estoque de padrão de oxamniquina (μL)	Volume da Solução estoque de padrão uk-3883 (μL)	Volume final (mL)	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$) Oxamniquina e uk-3883
Oxamniquina	Uk-3883				
80		400		5	80
90		450		5	90
100		500		5	100
110		550		5	110
120		600		5	120

4.4.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma mostra que pode ser determinada com precisão e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas⁷¹.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados através do desvio padrão (DP) e inclinação (I) da curva de calibração⁴⁶.

Foram efetuadas três leituras para cada concentração e calculado o desvio padrões dos resultados obtidos na linearidade.

O cálculo para a LD e LQ foi realizado pelas equações a seguir:

$$\text{LD} = (\text{Desvio Padrão}/\text{Inclinação da Curva}) \times 3,3$$

$$LQ = (\text{Desvio Padrão/Inclinação da Curva}) \times 10$$

4.4.6. Repetibilidade (intra-dia)

A repetibilidade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo obtidos pelo mesmo analista e utilizando a mesma instrumentação⁴⁶.

Para este estudo foram preparados soluções padrões de oxamniquina na concentração de $100,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e adição de padrão interno, a solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos, em seguida realizou-se 10 injeções sequenciais no aparelho de eletroforese capilar.

4.4.7. Repetibilidade (inter-dia)

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas e/ou equipamentos diferentes⁴⁶.

4.4.8. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão de um método deve ser realizada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações completando o intervalo linear do procedimento ou seja, em concentrações baixa, média e alta, com três replicadas cada³⁹.

A exatidão foi determinada pela adição de padrão de oxamniquina ao placebo nas concentrações de 80%, 100% e 120% referente à concentração nominal do método a partir de uma solução estoque.

Tabela 7 - Preparo das soluções para o teste de recuperação

Concentração (%)	Volume da Solução estoque padrão (µL)	Massa de placebo MG	Volume final (mL)	Concentração teórica µg mL ⁻¹
Oxamniquina e Uk-3883	Oxamniquina e uk-3883			Oxamniquina e uk-3883
80	400			80
100	500	4,0	5,0	100
120	600			120

4.5 Desenvolvimento do método de quantificação da oxamniquina por eletroforese capilar de zona (CZE)

Para o desenvolvimento de metodologia por eletroforese capilar foi realizado levantamento bibliográfico relacionado a oxamniquina e em seguida testes foram conduzidos na bancada a fim de definir as melhores condições para trabalhar com o fármaco e seus subprodutos.

As propriedades físico-químicas do fármaco foram avaliadas para a escolha do eletrólito (pH, concentração), uso de aditivos orgânicos, tensoativos (tipos e concentração), detecção e modo de injeção.

4.5.1. Preparo das soluções tampão

-Solução estoque de tampão fosfato 100 mmol.L⁻¹: foram transferidos 0,6900 g de fosfato de sódio monobásico para um balão volumétrico de 50 mL e solubilizado com

água ultrapurificada, com ajuda do aparelho de ultrassom por 10 minutos, completando o volume com o mesmo solvente (concentração final de 100 mmol.L^{-1}).

-Solução de trabalho tampão fosfato 25 mmol.L^{-1} : foram transferidos 2,5 mL de solução estoque de tampão fosfato 100 mmol.L^{-1} para balão volumétrico de 10 mL e diluído com água ultrapurificada completando o volume com o mesmo solvente. Após homogeneização, a solução foi ajustada com ácido orto-fosfórico 10% para pH 3.

-Solução de trabalho tampão fosfato 30 mmol.L^{-1} : foram transferidos 3,0 mL de solução estoque de tampão fosfato 100 mmol.L^{-1} para balão volumétrico de 10 mL e diluído com água ultrapurificada completando o volume com o mesmo solvente. Após homogeneização, a solução foi ajustada com ácido orto-fosfórico 10% para pH 3.

-Solução de trabalho tampão fosfato 35 mmol.L^{-1} : foram transferidos 3,5 mL de solução estoque de tampão fosfato 100 mmol.L^{-1} para balão volumétrico de 10 mL e diluído com água ultrapurificada completando o volume com o mesmo solvente. Após homogeneização, a solução foi ajustada com ácido orto-fosfórico 10% para pH de 3.

-Solução de trabalho tampão fosfato 40 mmol.L^{-1} : foram transferidos 4,0 mL de solução estoque de tampão fosfato 100 mmol.L^{-1} para balão volumétrico de 10 mL e diluído com água ultrapurificada completando o volume com o mesmo solvente. Após homogeneização, a solução foi ajustada com ácido orto-fosfórico 10% para pH de 3.

4.5.2. Preparo das soluções padrão

-Solução padrão estoque de oxamniquina: foram transferidos 10,0 mg de padrão de oxamniquina para um balão volumétrico de 10 mL e solubilizado com metanol completando o volume com o mesmo solvente (concentração final de $1000 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$);

-Solução padrão de trabalho de oxamniquina: foram transferidos 200 μL da solução padrão estoque de oxamniquina para um balão volumétrico de 2 mL; logo depois foram adicionados 200 μL de água ultrapura e 600 μL de metanol (concentração final de 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$);

-Solução padrão estoque de Uk-3883: foram transferidos 10,0 mg de padrão de Uk-3883 para um balão volumétrico de 10 mL e solubilizado com metanol completando o volume com o mesmo solvente (concentração final de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$);

-Solução padrão de trabalho de Uk-3883: foram transferidos 200 μL da solução padrão estoque de Uk-3883 para um balão volumétrico de 2 mL; logo depois foram adicionados 200 μL de água ultrapura e 600 μL de metanol (concentração final de 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$);

-Solução padrão estoque de atenolol: foram transferidos 10,0 mg de padrão de atenolol para um balão volumétrico de 10 mL e solubilizado com metanol completando o volume com o mesmo solvente (concentração final de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$);

-Solução padrão de trabalho de atenolol: foram transferidos 200 μL da solução padrão estoque de atenolol para um balão volumétrico de 2 mL, adicionado 200 μL de água ultrapura e 600 μL de metanol (concentração final de 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$);

Solução padrão estoque de cefalexina: foram transferidos 10,0 mg de padrão de cefalexina para um balão volumétrico de 10 mL e solubilizado com metanol completando o volume com o mesmo solvente (concentração final de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$);

-Solução padrão de trabalho de cefalexina: foram transferidos 200 μL da solução padrão estoque de cefalexina para um balão volumétrico de 2 mL, adicionado 200 μL de água ultrapura e 600 μL de metanol (concentração final de 100,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$);

-Solução padrão estoque de clozapina: foram transferidos 10,0 mg de padrão de clozapina para um balão volumétrico de 10 mL e solubilizado com etanol completando o volume com o mesmo solvente (concentração final de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$);

-Solução padrão de trabalho de clozapina: foram transferidos 200 μL da solução padrão estoque de clozapina para um balão volumétrico de 2 mL, adicionado 200 μL de água ultrapura e 600 μL de metanol (concentração final de $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$);

Todas as soluções foram sonicadas por 5 minutos para ajudar a dissolução e logo filtradas utilizando filtro de 0,45 μm (Millex).

4.6 Validação do método de quantificação da oxamniquina por eletroforese capilar de zona (CZE)

A validação foi realizada segundo os parâmetros e critérios propostos pela ANVISA, Farmacopéia Americana e *International Conference on Harmonization* (ICH).

4.6.1. Especificidade e seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente o composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz³⁸.

Para determinar a especificidade do método foram realizados testes de estresse no padrão, no placebo e nas amostras comerciais. Um dos principais objetivos a serem atingidos por meio deste teste é demonstrar que a metodologia aplicada é específica ao fármaco e aos possíveis subprodutos que possam ser desenvolvidos durante o estudo de estresse.

Na **Tabela 8** são demonstradas as condições utilizadas no teste de estresse.

Tabela 8 - Condições empregadas no teste de estresse

Condições de estresse		Exposição	Duração (horas)
Hidrólise ácida	HCl mol L ⁻¹	80°C	Até 48h
Hidrólise básica	NaOH mol L ⁻¹	80°C	Até 48h
Hidrólise neutra	H ₂ O	80°C	Até 48h
Oxidação	H ₂ O ₂	--	Até 48h
Térmica	--	60°C	7 dias
Fotólise	60		

Preparou-se uma solução estoque do padrão de oxamniquina em balão volumétrico de 50 mL: foram pesados 50,0 mg de padrão de oxamniquina e transferidos para o balão. Foram adicionados 20,0 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. Após observação da total dissolução do padrão, deixou-se a solução descansar por 10 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo concentração final de 1.000 µg.mL⁻¹ de oxamniquina. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos.

Preparou-se uma solução estoque do padrão de Uk-3883 em balão volumétrico de 50 mL: foram pesados 50,0 mg de padrão de Uk-3883 e transferidos para o balão. Foram adicionados 20,0 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. Após observação da total dissolução do padrão, deixou-se a solução descansar por 10 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo concentração final de 1.000 µg.mL⁻¹ de Uk-3883. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos.

Preparou-se uma solução padrão estoque de clozapina em balão volumétrico de 50mL: foram pesados 50,0 mg de padrão de clozapina para o balão. Foram adicionados 20,0 mL de etanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. Após observação da total dissolução do padrão, deixou-se a solução descansar por 10 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo concentração final de $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de clozapina. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos (concentração final de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$);

Para a solução estoque da amostra comercial foi pesado o conteúdo de 10 cápsulas de Mansil de 250mg, obtendo-se o volume médio conforme a tabela 05.

Em balão volumétrico de 50 mL foram pesados 68,1 mg do conteúdo da cápsula de Mansil (equivalente a 50mg de oxamniquina) e transferidos para o balão. Foram adicionados 20,0 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. O tempo no banho de ultrassom foi o mesmo observado para a dissolução dos padrões de oxamniquina e do uk-3883 incluindo o tempo de descanso de 10 minutos seguidos pela complementação do volume com o mesmo solvente chegando a uma concentração teórica de $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos.

Preparou-se uma solução estoque do placebo em balão volumétrico de 50 mL: foram pesados 170,2 mg do placebo (equivalente ao peso de uma cápsula de Mansil de 250mg) e transferidos para o balão. Foram adicionados 20,0 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. O tempo no banho de ultrassom foi o mesmo observado para a dissolução dos padrões de oxamniquina e do uk-3883 incluindo o tempo de descanso de 10 minutos seguidos pela complementação do

volume com o mesmo solvente. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos.

4.6.1.1. Hidrólise ácida

Transferiu-se alíquota de 1,0 mL da solução padrão estoque de oxamniquina, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida adicionou-se 1,0 mL de ácido clorídrico 1M. Os balões foram levados a banho-maria em temperatura controlada de 80°C. Após os tempos indicados, foi retirado um balão do banho-maria, esperado 10 minutos para que o frasco chegasse a temperatura ambiente e adicionados 1,0 mL de hidróxido de sódio 1M para neutralizar a solução. Foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Transferiu-se alíquota de 1,0 mL da solução estoque de amostra comercial, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida adicionou-se 1,0 mL de ácido clorídrico 1M. Os balões foram levados a banho-maria em temperatura controlada de 80°C. Após os tempos indicados, foi retirado um balão do banho-maria, esperado 10 minutos para que o frasco chegasse a temperatura ambiente e adicionados 1,0 mL de hidróxido de sódio 1M para neutralizar a solução. Foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Transferiu-se alíquota de 1,0 mL da solução estoque de placebo, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida

adicionou-se 1,0 mL de ácido clorídrico 1M. Os balões foram levados a banho-maria em temperatura controlada de 80°C. Após os tempos indicados, foi retirado um balão do banho-maria, esperado 10 minutos para que o frasco chegasse a temperatura ambiente e adicionados 1,0 mL de hidróxido de sódio 1M para neutralizar a solução. Foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

4.6.1.2. Hidrólise básica

Transferiu-se alíquota de 1,0 mL da solução padrão estoque de oxamniquina, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida adicionou-se 1,0 mL de hidróxido de sódio 1M. Os balões foram levados a banho-maria em temperatura controlada de 80 °C. Após os tempos indicados, foi retirado um balão do banho-maria, esperado 10 minutos para que o frasco chegasse a temperatura ambiente e adicionados 1,0 mL de ácido clorídrico 1M para neutralizar a solução. Foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80 % e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Transferiu-se alíquota de 1,0 mL da solução estoque da amostra comercial, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida adicionou-se 1,0 mL de hidróxido de sódio 1M. Os balões foram levados a banho maria em temperatura controlada de 80 °C. Após os tempos indicados, foi retirado um balão do banho maria, esperado 10 minutos para que o frasco chegasse a

temperatura ambiente e adicionados 1,0 mL de ácido clorídrico 1M para neutralizar a solução. Foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80 % e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Transferiu-se alíquota de 1,0 mL da solução estoque do placebo, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida adicionou-se 1,0 mL de hidróxido de sódio 1M. Os balões foram levados a banho maria em temperatura controlada de 80 °C. Após os tempos indicados, foi retirado um balão do banho maria, esperado 10 minutos para que o frasco chegasse a temperatura ambiente e adicionados 1,0 mL de ácido clorídrico 1M para neutralizar a solução. Foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

4.6.1.3. Hidrólise oxidativa

Transferiu-se alíquotas de 1,0 mL da solução padrão estoque de oxamniquina, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida adicionou-se 1,0 mL de H₂O₂ 3%. Após os tempos indicados foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Transferiu-se alíquotas de 1,0 mL da solução estoque da amostra comercial, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em

seguida adicionou-se 1,0 mL de H₂O₂ 3%. Após os tempos indicados foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Transferiu-se alíquotas de 1,0 mL da solução estoque do placebo, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida adicionou-se 1,0 mL de H₂O₂ 3%. Após os tempos indicados foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

4.6.1.4. Hidrólise neutra

Transferiu-se alíquotas de 1,0 mL da solução padrão estoque de oxamniquina, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida adicionou-se 1,0 mL de água ultrapura. Após os tempos indicados, foi retirado um balão do banho-maria, esperado 10 minutos para que o frasco chegasse a temperatura ambiente foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Transferiu-se alíquotas de 1,0 mL da solução estoque da amostra comercial, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida adicionou-se 1,0 mL de água ultrapura. Após os tempos indicados, foi retirado um balão do banho-maria, esperado 10 minutos para que o frasco chegasse a

temperatura ambiente foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Transferiu-se alíquotas de 1,0 mL da solução estoque do placebo, cujo preparo fora mencionado anteriormente, para balões volumétricos de 10,0 mL, em seguida adicionou-se 1,0 mL de água ultrapura. Após os tempos indicados, foi retirado um balão do banho-maria, esperado 10 minutos para que o frasco chegasse a temperatura ambiente foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

4.6.1.5. Fotólise

Foram pesados 50 mg de padrão do oxamniquina, da amostra comercial e do placebo e transferidos cada um para um vidro de relógio, individualmente. O vidro de relógio foi exposto à condição ICH: opção 2, por 60 horas, sob temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Manteve-se o controle protegido da luz com papel alumínio pelo mesmo período. Segue o preparo das soluções a partir das amostras expostas:

Preparou-se uma solução padrão de oxamniquina em balão volumétrico de 10 mL: foram pesados 10,0 mg de padrão de oxamniquina e transferidos para o balão. Foram adicionados 5,0 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. Após observação da total dissolução do padrão, deixou-se a solução descansar por 10 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo

concentração final de $1.000 \mu\text{m mL}^{-1}$ de oxamniquina. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos. Após 10 minutos de descanso da solução, foi transferida uma alíquota de 1,0 mL para um balão de 10 mL foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Preparou-se uma solução de amostra comercial em balão volumétrico de 10 mL: foram pesados 10,0 mg de amostra de Mansil e transferidos para o balão. Foram adicionados 5 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. Após observação da total dissolução do padrão, deixou-se a solução descansar por 10 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo concentração final de $1.000 \mu\text{m mL}^{-1}$ de oxamniquina. Após 10 minutos de descanso da solução, foi transferida uma alíquota de 1,0 mL para um balão de 10 mL foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Preparou-se uma solução de placebo em balão volumétrico de 10 mL: foram pesados 10,0 mg do placebo e transferidos para o balão. Foram adicionados 10 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. Após deixou-se a solução descansar por 10 minutos e completou-se ao volume com o mesmo solvente. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos. Após 10 minutos de descanso da solução, foi transferida uma alíquota de 1,0 mL para um balão de 10 mL foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida,

o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

4.6.1.6. Térmica

Foram pesados 50 mg de padrão do oxamniquina, de amostra comercial de Mansil e do placebo e transferidos para placas de petri, individualmente. As placas de petri foram expostas ao calor de $60 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 7 dias em estufa com controle da temperatura. Segue o preparo das soluções a partir das amostras expostas:

Preparou-se uma solução padrão de oxamniquina em balão volumétrico de 10 mL: foram pesados 10,0 mg de padrão de oxamniquina e transferidos para o balão. Foram adicionados 5,0 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. Após observação da total dissolução do padrão, deixou-se a solução descansar por 10 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo concentração final de $1.000 \mu\text{m mL}^{-1}$ de oxamniquina. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos. Após 10 minutos de descanso da solução, foi transferida uma alíquota de 1,0 mL para um balão de 10 mL foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Preparou-se uma solução de amostra comercial em balão volumétrico de 10 mL: foram pesados 10,0 mg de amostra de Mansil e transferidos para o balão. Foram adicionados 5 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. Após observação da total dissolução do padrão, deixou-se a solução descansar por 10 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo concentração final

de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de oxamniquina. Após 10 minutos de descanso da solução, foi transferida uma alíquota de 1,0 mL para um balão de 10 mL foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

Preparou-se uma solução de placebo em balão volumétrico de 10 mL: foram pesados 10,0 mg do placebo e transferidos para o balão. Foram adicionados 10 mL de metanol e o balão foi levado a banho de ultrassom por 5 minutos. Após deixou-se a solução descansar por 10 minutos e completou-se ao volume com o mesmo solvente. A solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos. Após 10 minutos de descanso da solução, foi transferida uma alíquota de 1,0 mL para um balão de 10 mL foi adicionada a solução 1,0 mL da solução padrão estoque de clozapina. Em seguida, o volume do balão foi completado com metanol 80% e levado a banho de ultrassom por 5 minutos. A solução foi filtrada e injetada no equipamento de eletroforese capilar.

4.6.2. Linearidade

De acordo com a Resolução nº899, linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico.

Para calcular a linearidade foram tomadas alíquotas no intervalo de concentração de 80,0 a 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução padrão estoque de oxamniquina e padrão estoque de uk-3883, conforme tabela:

Tabela 9 - Preparo das soluções para o teste de linearidade

Concentração (%)		Volume da Solução estoque de padrão de oxamniquina (μL)	Volume da Solução estoque de padrão uk-3883 (μL)	Volume da Solução estoque de padrão de clozapina (μL)	Volume final (mL)	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$) Oxamniquina e uk-3883
Oxa	Uk					
80		400				80
90		450				90
100		500		500	5	100
110		550				110
120		600				120

As curvas analíticas foram construídas a partir dos resultados das áreas dos picos obtidos dessas injeções versus as concentrações trabalhadas.

4.6.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma mostra que pode ser determinada com precisão e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas⁷¹.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados através do desvio padrão (DP) e inclinação (I) da curva de calibração⁴⁶.

Foram efetuadas três leituras para cada concentração e calculado o desvio padrão dos resultados obtidos na linearidade.

O cálculo para a LD e LQ foi realizado pelas equações a seguir:

$$LD = (\text{Desvio Padrão/Inclinação da Curva}) \times 3,3$$

$$LQ = (\text{Desvio Padrão/Inclinação da Curva}) \times 10$$

4.6.4. Repetibilidade (intra-dia)

A repetibilidade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo obtidos pelo mesmo analista e utilizando a mesma instrumentação⁴⁶.

Para este estudo foram preparados soluções padrões de oxamniquina na concentração de $100,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e adição de padrão interno, a solução foi mantida em banho de ultrassom por 5 minutos, em seguida realizou-se 10 injeções sequenciais no aparelho de eletroforese capilar.

4.6.5. Repetibilidade (inter-dia)

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas e/ou equipamentos diferentes⁴⁶.

Para a determinação da precisão intermediária foram preparadas três amostras de cápsulas (20% acima e abaixo da concentração nominal

4.6.6. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão de um método deve ser realizada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações completando o intervalo linear

do procedimento ou seja, em concentrações baixa, média e alta, com três replicadas cada⁴⁶.

A exatidão foi determinada pela adição de padrão de oxamniquina ao placebo nas concentrações de 80%, 100% e 120% referente à concentração nominal do método a partir da solução estoque de padrão de oxamniquina.

Tabela 10 - Preparo das soluções para o teste de recuperação

Concentração (%)	Volume da Solução estoque padrão de Oxamniquina (µL)	Volume da Solução estoque de padrão de uk-3883 (µL)	Volume da Solução estoque de padrão de clozapina (µL)	Massa de placebo mg	Volume final (mL)	Concentração teórica µg mL ⁻¹ Oxamniquina e uk-3883
Oxamniquina e Uk-3883	400					
80	500		500	4,0	5,0	80
100	600					100
120						120

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Método de identificação da oxamniquina

Ponto de fusão: a determinação da faixa de fusão da oxamniquina apresentou resultados compreendidos em um intervalo entre 146 °C-148 °C. As temperaturas de fusão estão dentro dos limites estipulados pela literatura³⁴.

Resultado obtido: 147 °C (Equipamento Stuart Scientific modelo SMP1)

Espectrofotometria no ultravioleta (UV): o espectro de absorção correspondente a oxamniquina foi obtido na varredura de 190 a 600 nm (Figura 5). Os comprimentos de onda correspondentes ao máximo de absorbância do analito foram selecionados para posterior determinação analítica pelos métodos cromatográficos com detecção no UV. Os comprimentos de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) foram 205 nm e 250 nm.

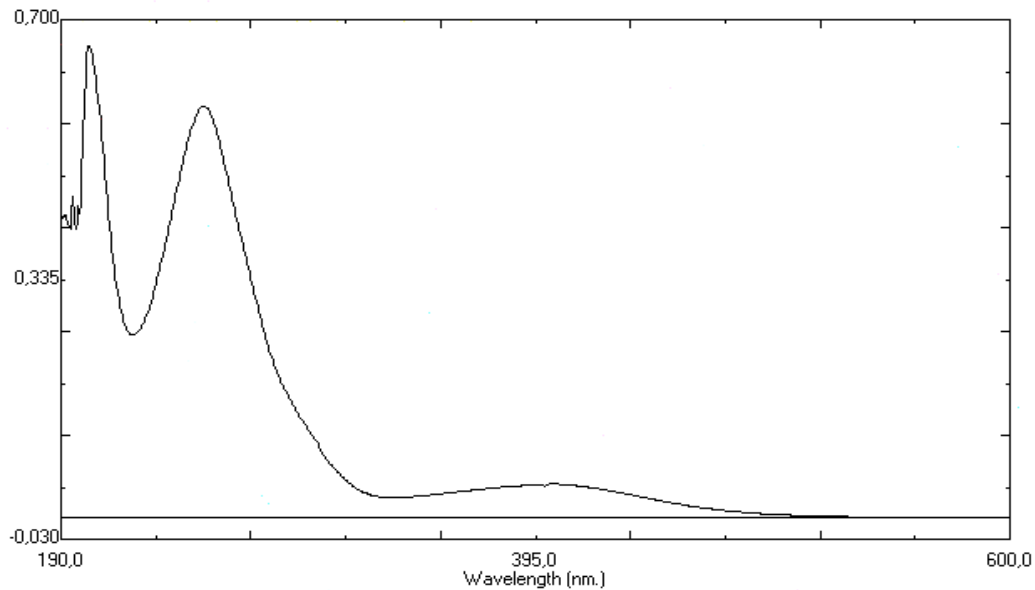


Figura 5. Espectro de absorção no ultravioleta de oxamniquina 5,0 µg. mL⁻¹

Espectrofotometria no ultravioleta (UV): experimento do IR foi conduzido utilizando espectrofotômetro *Parker Elmer*. A figura 6 apresenta o resultado obtido.

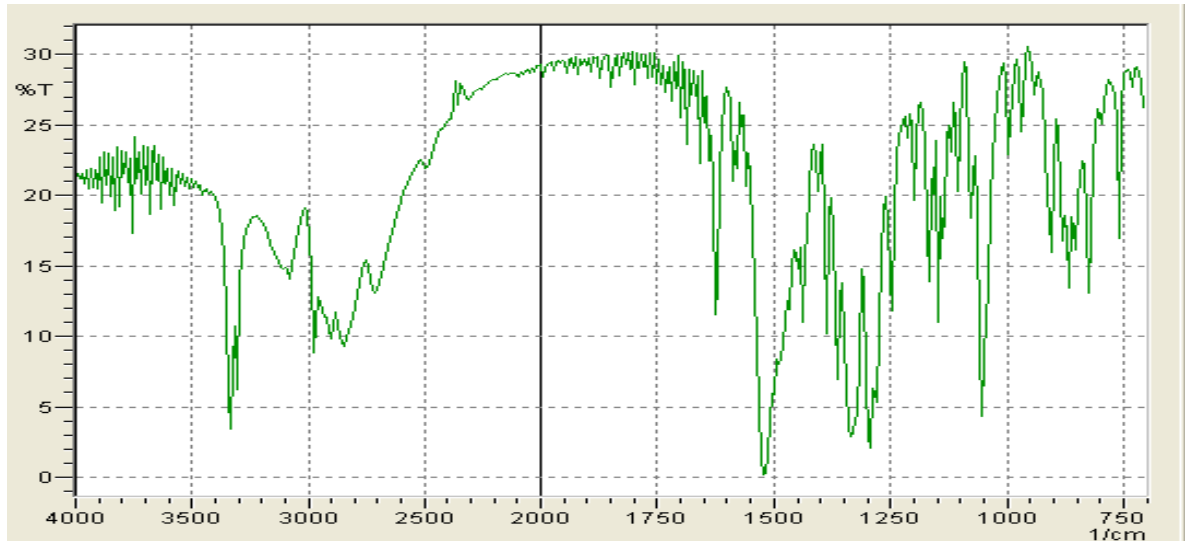


Figura 6. Espectro de absorção da oxamniquina na região do infravermelho (IR)

Tabela 11 - Bandas do espectro de absorção da oxamniquina na região do IR

$\nu(\text{cm}^{-1})$	Atribuição
3350 – 3380	Deformação do N-H
3000 – 3050	Deformação axial da ligação C-H aromáticos
2850-3000	Deformação axial da ligação C-H alifáticos
1700	Carbonila C ₂₀

5.2 Metodologia analítica desenvolvida por cromatografia líquida de alta eficiência

5.2.1. Testes preliminares

Com a finalidade de padronizar uma metodologia eficiente para análises de identificação e quantificação de oxamniquina e sua impureza, alguns testes

preliminares foram realizados para verificação dos constituintes da fase móvel e suas concentrações, conforme Tabela 04, seu fluxo e temperatura, a verificação do comprimento de onda adequado, volume da injeção da amostra. Foram ajustadas as condições de análise, ou seja, os parâmetros variáveis do equipamento.

5.2.2. Verificação dos parâmetros para cromatografia líquida de alta eficiência

No desenvolvimento do método analítico por HPLC foi trabalhado inicialmente com a coluna uma coluna octadesilsilano (C18), e foram definidos parâmetros iniciais, baseados nas características físico-químicas do ativo. A coluna C18 utilizada foi a Nucleosil com comprimento de 150mm, 4,6 mm de diâmetro e partícula de 5µm.

O comprimento de onda trabalho, conforme resultados obtidos no espectro de varredura por espectrofotômetro foi 254nm, condição posteriormente confirmada por DAD em equipamento HPLC.

Após definição do comprimento de onda da análise, iniciaram-se alguns testes no equipamento a fim de chegar aos parâmetros adequados para quantificação da oxamniquina e de sua impureza. Nesse sentido, algumas combinações foram testadas: água: acetonitrila nas proporções 10:90 (v/v); 25:75 (v/v); água 0,1% ácido orto-fosfórico: metanol nas proporções: 10:90 (v/v); 20:80 (v/v); 40:60 (v/v).

Das combinações testadas a que apresentou melhores parâmetros de resolução, assimetria e número de pratos foi: água 0,1% ácido orto-fosfórico: metanol 40:60 (v/v) em fluxo de 1,0 mL / min, conforme tabela abaixo:

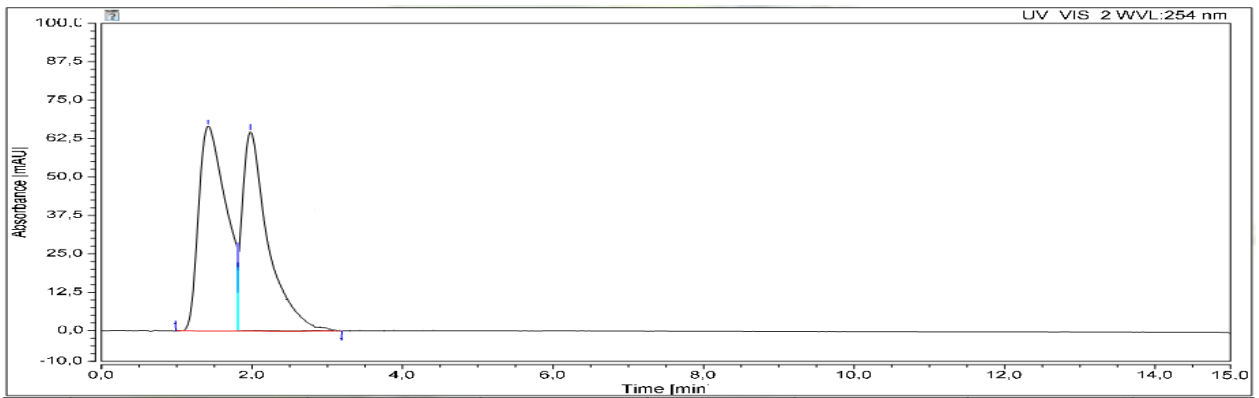


Figura 7. Cromatograma da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel ACN : água (90:10, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

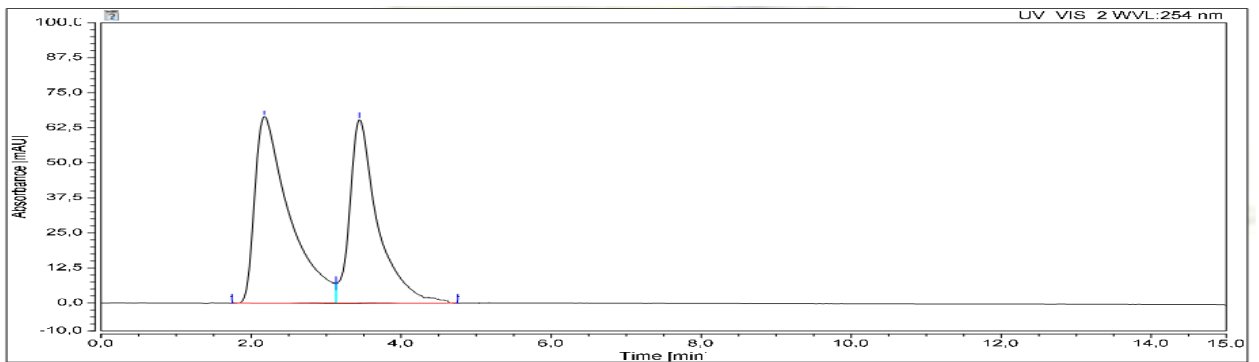


Figura 8. Cromatograma da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel ACN : água (75:25, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

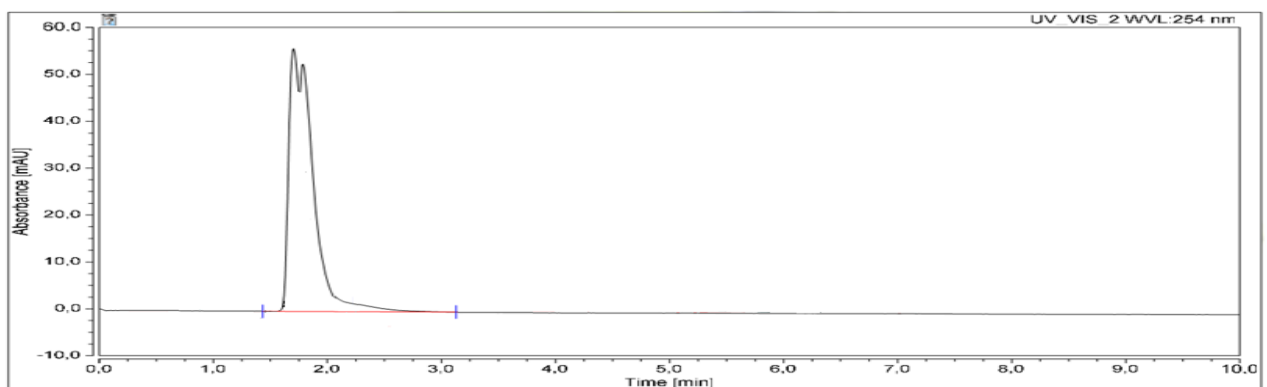


Figura 9. Cromatograma da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (90:10, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

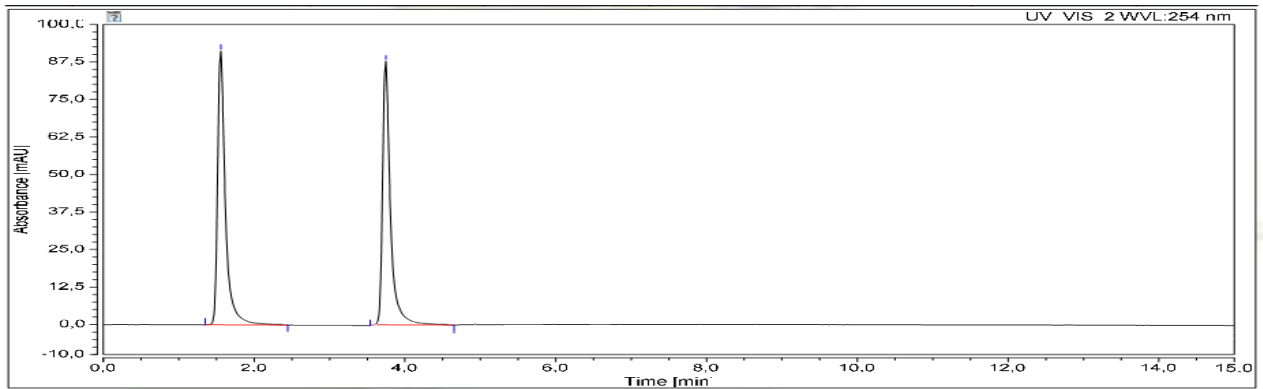


Figura 10. Cromatograma da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (80:20, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

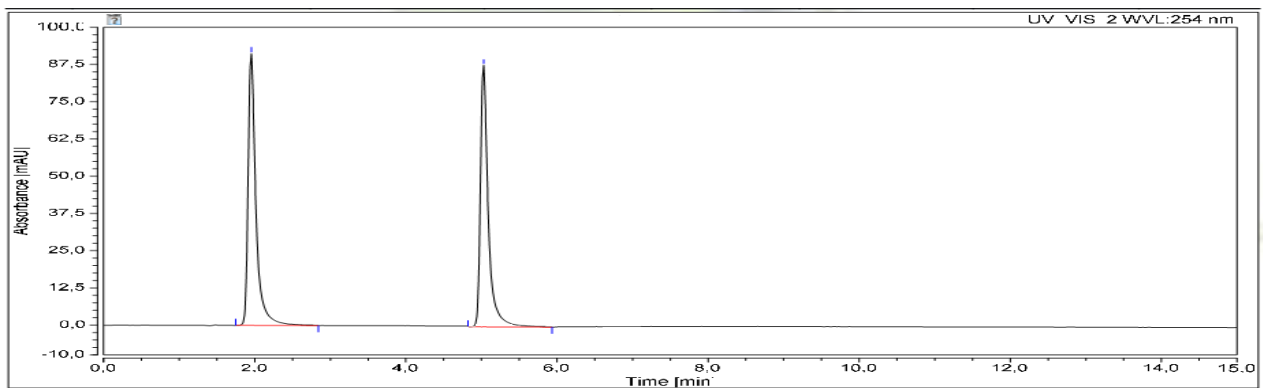


Figura 11. Cromatograma da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

Quadro 1 - Resultados de adequabilidade do sistema (System suitability)

Parâmetros	Oxamniquina \pm DPR	Uk - 3883 \pm DPR
Tempo de retenção	$1,978 \pm 1,2$	$5,091 \pm 1,4$
Área dos picos	$120,526 \pm 0,8$	$110,073 \pm 0,6$
Nº de pratos	$2210 \pm 2,1$	$1980 \pm 2,9$
Resolução	-----	$11,3 \pm 1,2$
Assimetria	$1,3 \pm 4,2$	$1,1 \pm 3,5$

Assim, o método analítico desenvolvido teve as seguintes condições cromatográficas determinadas:

Quadro 2 – Parâmetros cromatográficos

Fase móvel (Isocrático)	Metanol: Água 0.1% ácido orto-fosfórico (60:40 v/v)
Vazão	1,0 mL/minuto
Coluna	Nucleosil (150 mm x 4,6 mm x 5µm)
Volume de injeção	2 µL
Temperatura da coluna	20 °C
Comprimento de onda	254 nm
Detector	DAD
Tempo de retenção	Oxamniquina 1,9 minutos
	Uk-3883 5,1 minutos
Tempo de corrida	15 minutos

5.3 Validação do método por HPLC

5.3.1. Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através dos testes de estresse aplicados ao padrão, ao placebo e a amostra comercial a fim de conhecer o comportamento químico do ativo sob diferentes condições.

As amostras foram submetidas a condições estresse por hidrólise ácida, alcalina, neutra, oxidativa, térmica (60°C) e fotolítica por um período de 60 horas em seguida avaliado através do método proposto.

Os cromatogramas obtidos estão apresentados nas Figuras 12 a 20:

Tabela 12 - Resultados obtidos após condições de estresse da solução padrão de trabalho – Oxamniquina e Uk-3883

Condição		% de resposta em relação a condição não estressada			
		Oxamniquina		Uk-3883	
		Área	%	Área	%
Tempo 0		120,526	100%	110,073	100%
Hidrólise ácida	4h	118,984	98,721	106,839	97,062
	8h	116,415	96,589	101,236	91,972
	24h	92,098	76,413	92,803	84,31
	48h	88,289	73,253	74,78	67,937
hidrólise básica	4h	118,563	98,371	104,899	95,299
	8h	117,254	97,285	101,989	92,656
	24h	111,092	92,173	101,223	91,96
	48h	109,2	90,603	96,8	87,942
Hidrólise oxidativa	4h	119,011	98,743	107,903	98,029
	8h	116,56	96,709	99,083	90,016
	24h	110,983	92,082	93,928	85,332
	48h	98,413	81,653	84,6	76,858
Hidrólise neutra	4h	119,023	98,753	108,334	98,42
	8h	117,213	97,251	103,733	94,24
	24h	109,241	90,637	98,853	89,807
	48h	106,516	88,376	95,679	86,923
Fotólise		111,723	92,696	98,889	89,839
Térmica		112,725	93,528	102,652	93,258

Nas **Figuras 12 a 20** podem ser observados os cromatogramas referentes à análise que avaliou o estresse da solução padrão de oxamniquina e uk-3883, onde a presença dos picos de degradação não interfere nos picos de interesse.

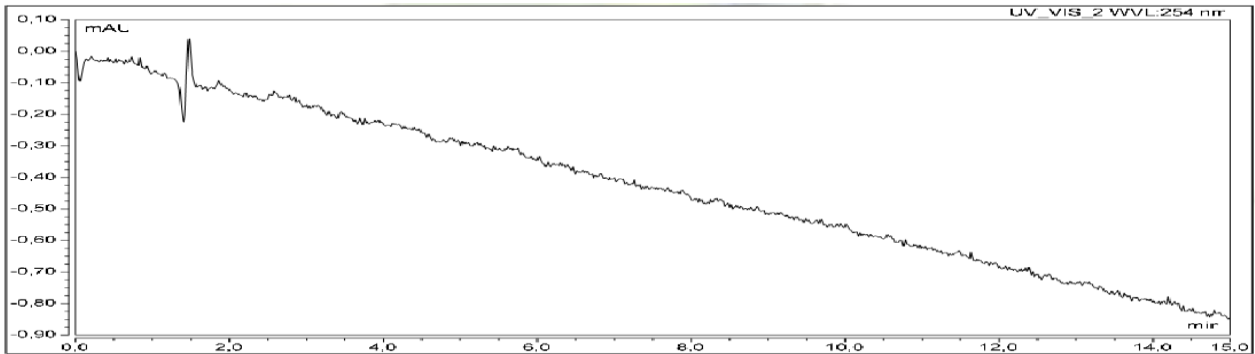


Figura 12. Cromatograma da solução diluente (água purificada : metanol 20:80 v/v). Coluna: Nucleosil C18 e 150 x 4,6 mm x 5 μ m (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e volume de injeção 2 μ L.

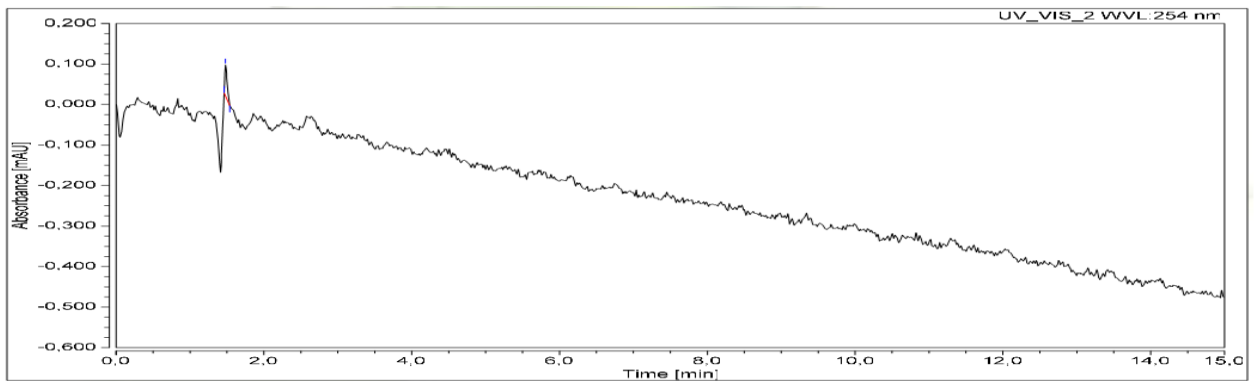


Figura 13. Cromatograma da solução placebo. Coluna: Nucleosil C18 e 150 x 4,6 mm x 5 μ m (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e volume de injeção 2 μ L.

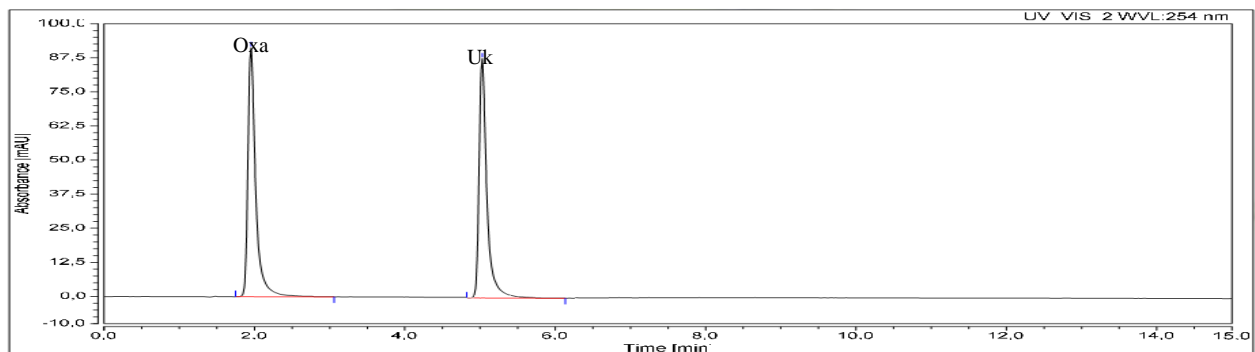


Figura 14. Cromatograma da solução padrão contendo oxamiquina 100,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, uk-3883 100,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Condição: HCl 1 mmol L^{-1} /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e 150 x 4,6 mm x 5 μ m (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e volume de injeção 2 μ L.

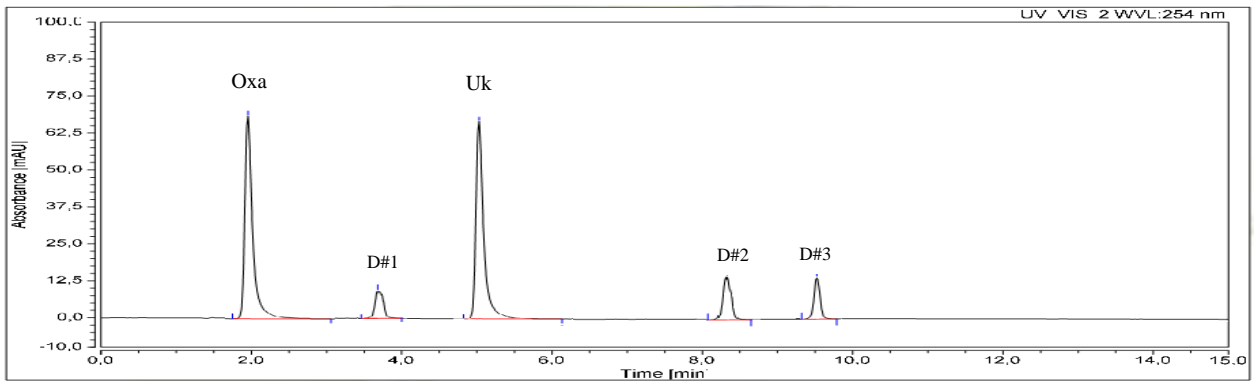


Figura 15. Cromatograma obtido após hidrólise ácida da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Condição: HCl 1 mmol L^{-1} /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40 v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

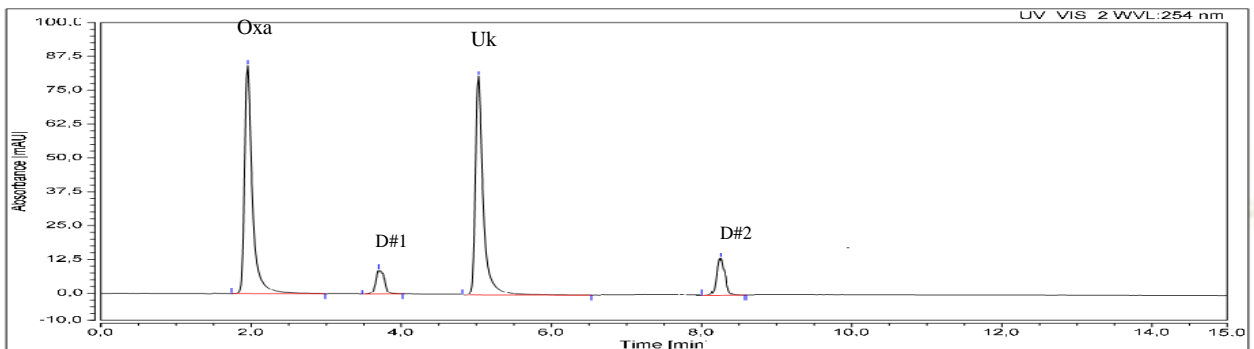


Figura 16. Cromatograma obtido após hidrólise básica da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Condição: NaOH 1 mmol L^{-1} /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

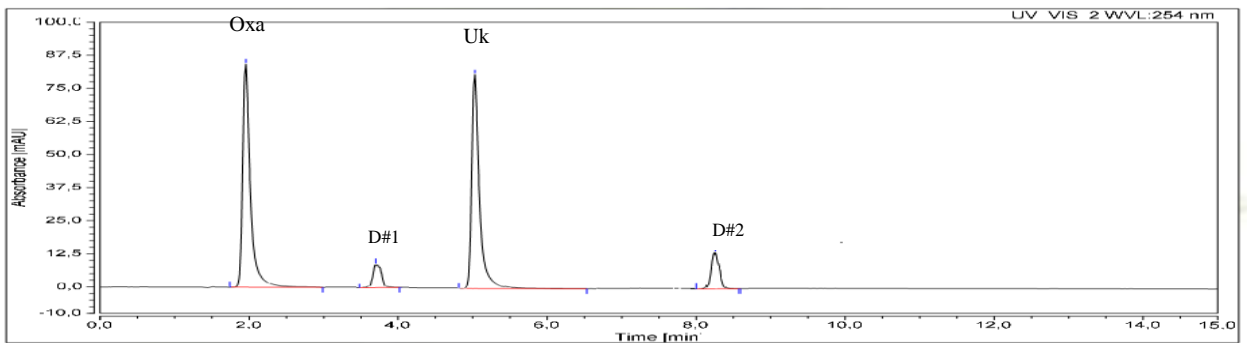


Figura 17. Cromatograma obtido após hidrólise neutra da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Condição: 80°C /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

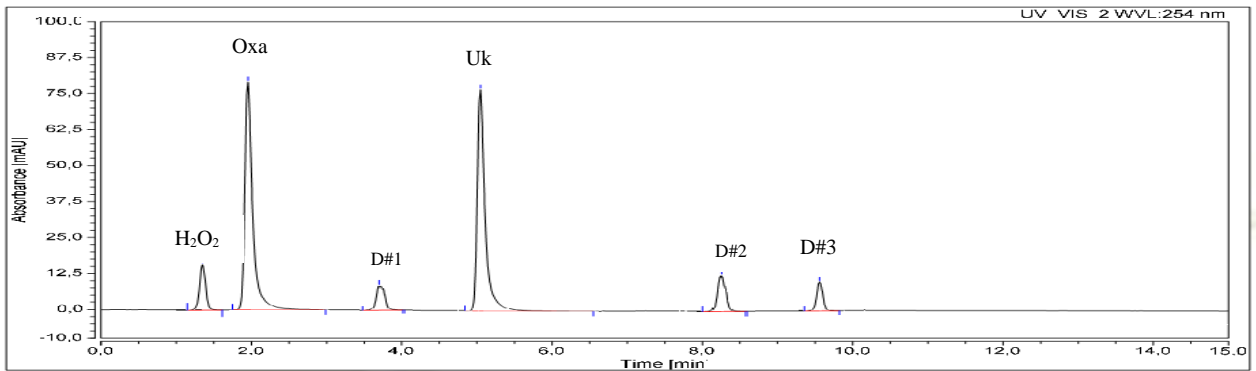


Figura 18. Cromatograma obtido após estresse oxidativo da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Condição: HCl 1 mmol L^{-1} /48horas. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

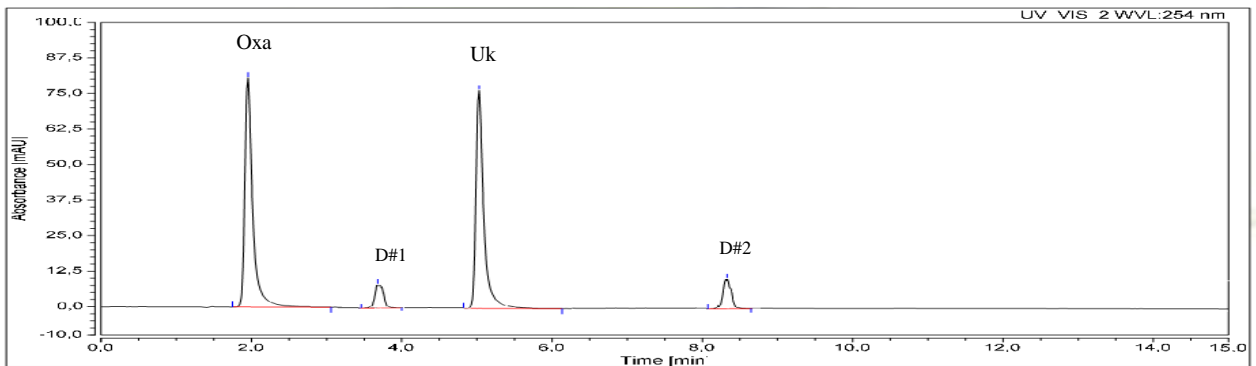


Figura 19. Cromatograma obtido após estresse por fotólise da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

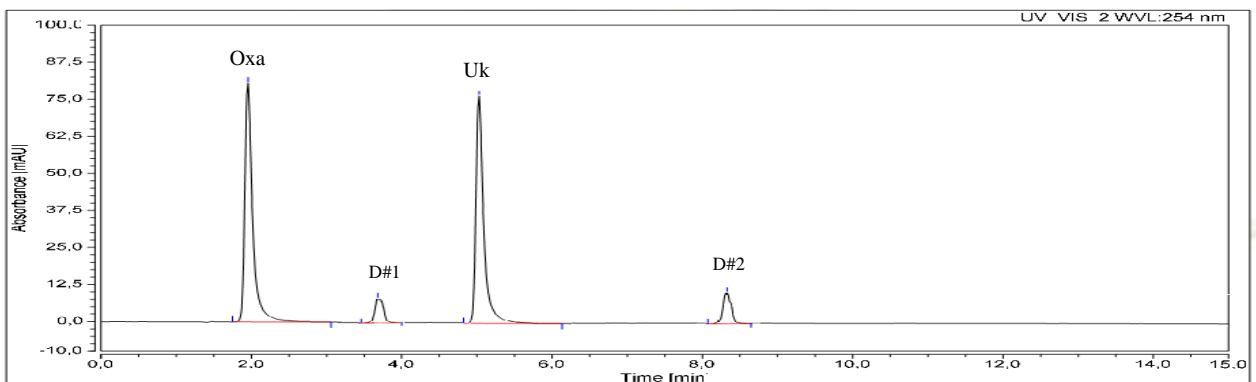


Figura 20. Cromatograma obtido após estresse térmico da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Condição: $60^\circ\text{C}/7$ dias. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

Observou-se que a oxa e a uk são mais sensíveis à hidrólise ácida com formação de possíveis produtos de degradação nos $tr = 3,8$ minutos, $8,4$ minutos e $9,6$ minutos apresentando degradação de aproximadamente 27% e 32% para oxa e uk respectivamente (**Figura 15**).

Para a degradação oxidativa as degradações de oxa e uk foram de 18% e 15% respectivamente (**Figura 17**) com o surgimento do pico de peróxido de hidrogênio em $1,3$ minutos.

Para todas as outras amostras houve aparecimento de possíveis picos de degradação nos $tr = 3,8$ minutos e $9,6$ minutos com porcentagem de degradação variada dos ativos. As amostras submetidas a hidrólise básica apresentaram degradação de 10% e 13% para oxa e uk, respectivamente (**Figura 16**); amostras submetidas a degradação neutra apresentaram degradação de 12% e 13% para oxa e uk, respectivamente (**Figura 18**); amostras submetidas a fotólise obtiveram respostas de 8% para oxa e 11% para uk (**Figura 19**); a análise das amostras submetidas ao calor apresentou degradação de 7% para ambos ativos, oxa e uk (**Figura 20**).

A resolução entre os picos dos possíveis degradantes e os picos principais foi satisfatória ($R_s \geq 1,5$).

Tabela 13 - Resultados obtidos após condições de estresse da solução amostra comercial

Condição		% de resposta em relação a condição não estressada - amostra comercial	
		Oxamniquina	
		Área	%
Tempo 0		120,526	100
Hidrólise ácida	4h	118,763	98,537
	8h	115,927	96,184
	24h	91,637	76,031
	48h	90,63	75,195
hidrólise básica	4h	117,371	97,382
	8h	116,928	97,015
	24h	110,826	91,952
	48h	108,112	89,7
Hidrólise oxidativa	4h	118,972	98,711
	8h	114,821	95,267
	24h	109,27	90,661
	48h	99,823	82,823
Hidrólise neutra	4h	118,934	98,679
	8h	115,983	96,231
	24h	110,873	91,991
	48h	107,862	89,493
Fotólise		112,81	93,598
Térmica		117,982	97,889

Nas **Figuras 21 a 29** podem ser observados os cromatogramas referentes ao estresse da solução amostra comercial, onde a presença dos picos de degradação não interfere nos picos de interesse.

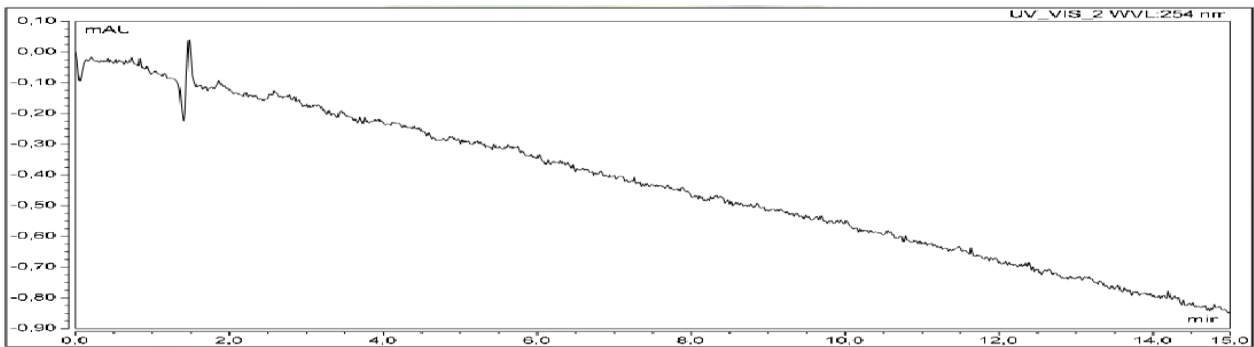


Figura 21. Cromatograma da solução diluente (água purificada : metanol 20:80 v/v). Coluna: Nucleosil C18 e 150 x 4,6 mm x 5 μ m (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e volume de injeção 2 μ L.

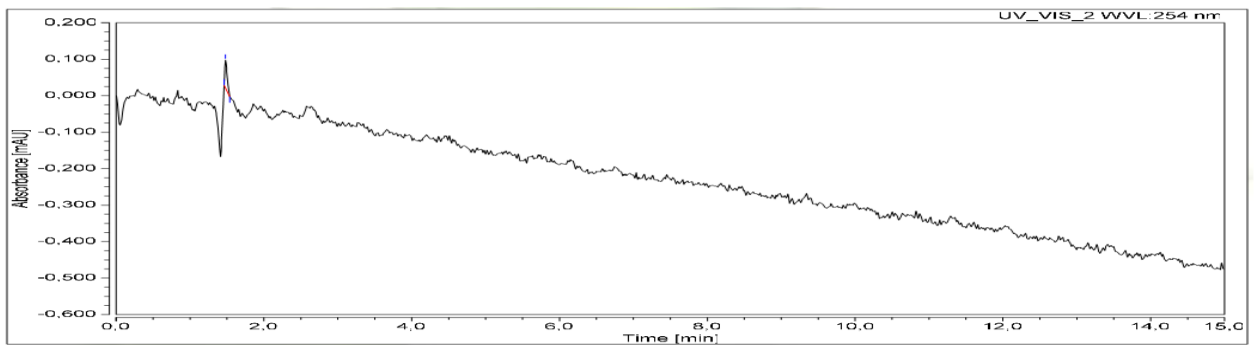


Figura 22. Cromatograma da solução placebo. Coluna: Nucleosil C18 e 150 x 4,6 mm x 5 μ m (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e volume de injeção 2 μ L.

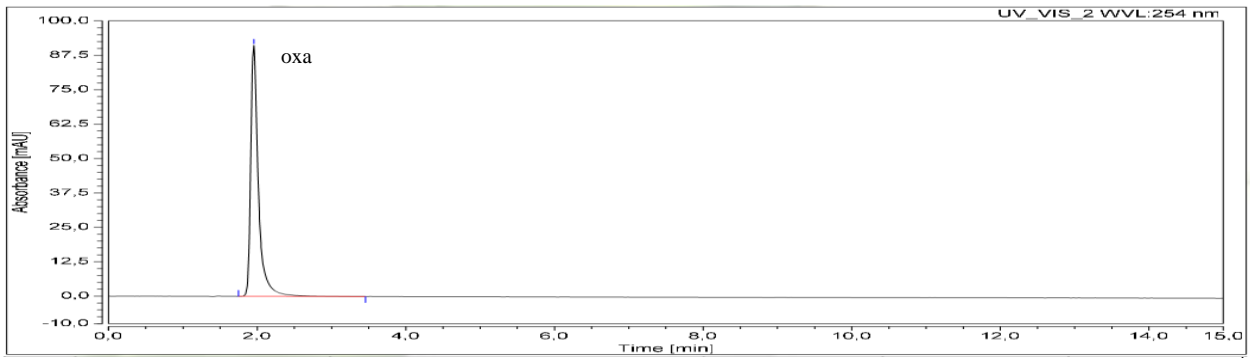


Figura 23. Cromatograma da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Condição: HCl $1 \text{ mmol L}^{-1}/48\text{horas}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água $0,1\%$ ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

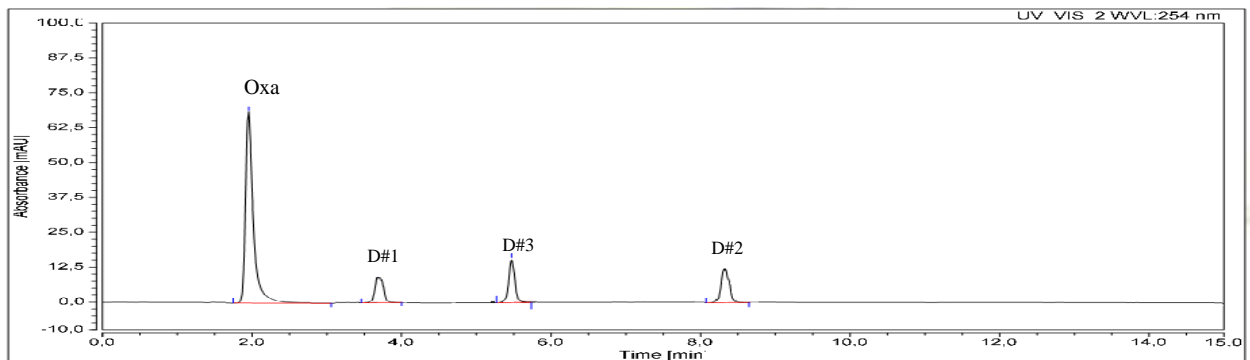


Figura 24. Cromatograma obtido após hidrólise ácida da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Condição: HCl $1 \text{ mmol L}^{-1}/48\text{horas}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água $0,1\%$ ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

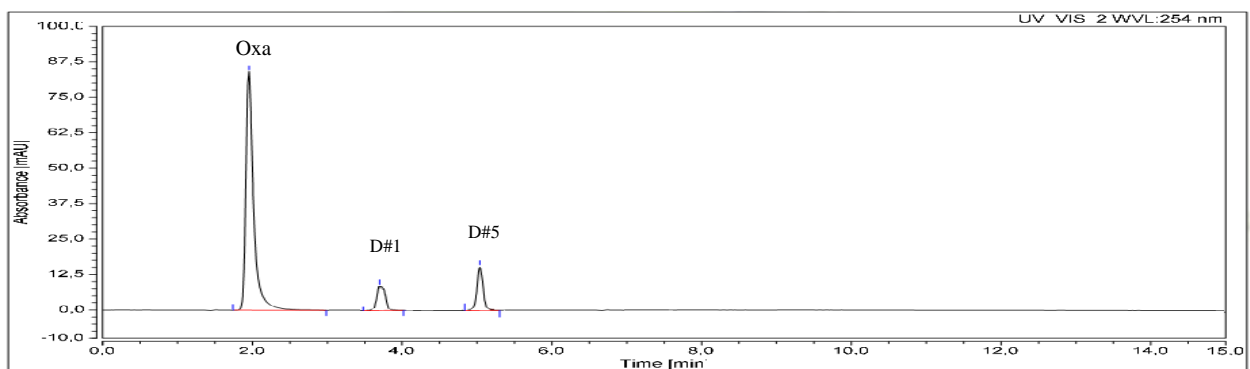


Figura 25. Cromatograma obtido após hidrólise básica da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Condição: NaOH $1 \text{ mmol L}^{-1}/48\text{horas}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água $0,1\%$ ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

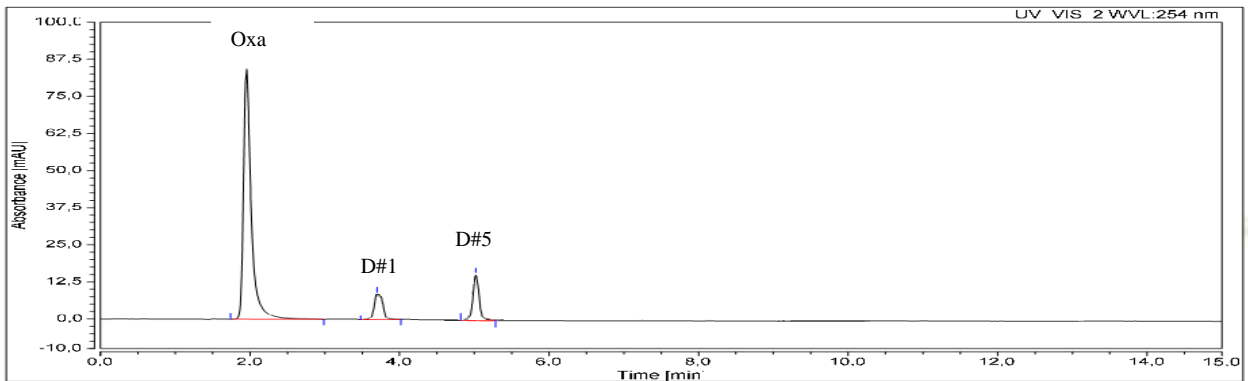


Figura 26. Cromatograma obtido após hidrólise neutra da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Condição: $80^\circ\text{C}/48\text{horas}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$

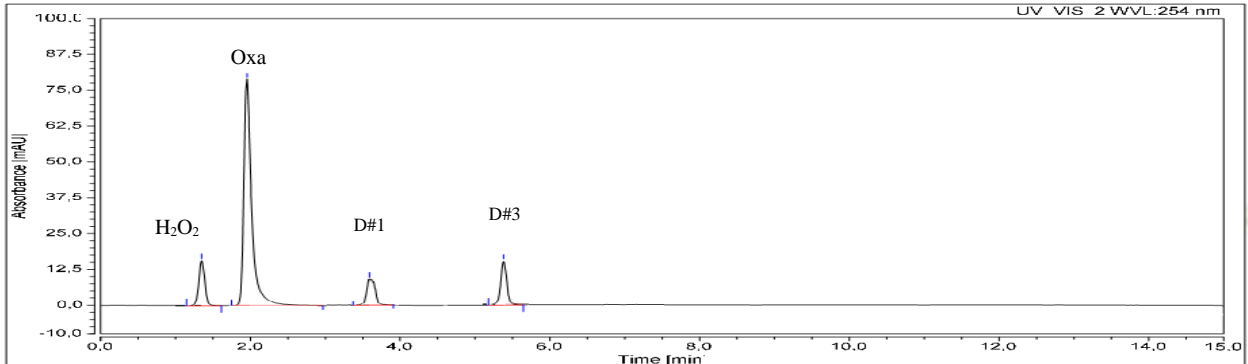


Figura 27. Cromatograma obtido após estresse oxidativo da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Condição: $\text{H}_2\text{O}_2/48\text{horas}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

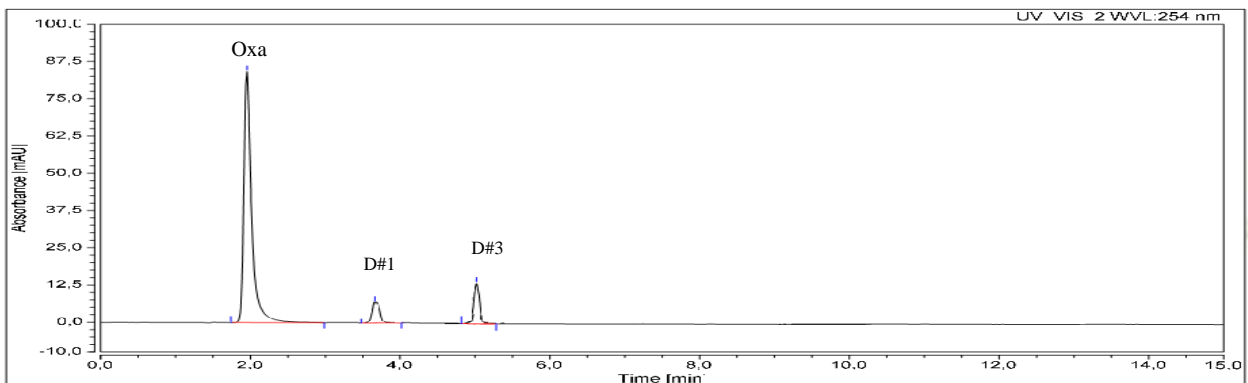


Figura 28. Cromatograma obtido após estresse por fotólise da solução padrão de trabalho contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5\mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido orto-fosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2\mu\text{L}$.

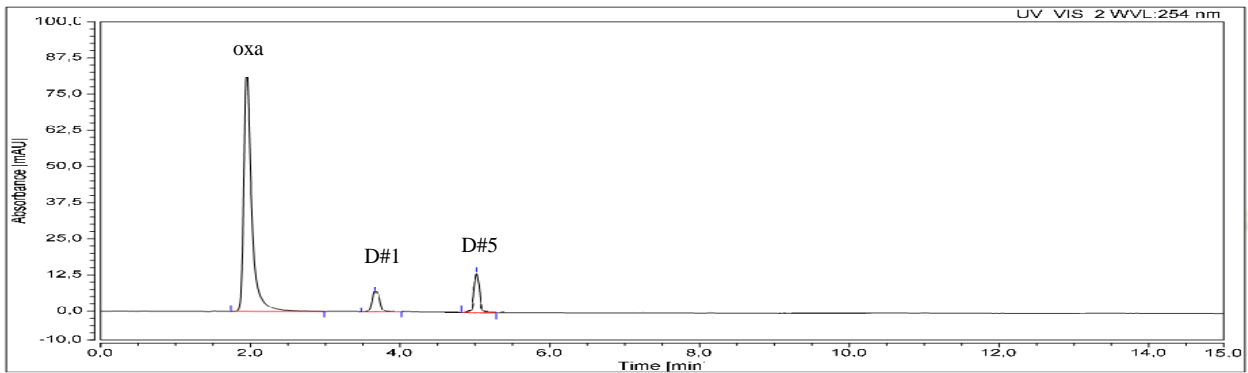


Figura 29. Cromatograma obtido após estresse térmico da solução padrão de trabalho contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição: $60 \text{ }^\circ\text{C}/7$ dias. Coluna: Nucleosil C18 e $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ (Thermo); fase móvel MeOH : água 0,1% ácido ortofosfórico (60:40, v/v) temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e volume de injeção $2 \mu\text{L}$.

Nas amostras comerciais submetidas ao estudo de degradação forçada obteve-se os seguintes resultados: na hidrólise ácida observa-se a formação de possíveis produtos de degradação nos $t_r = 3,8$ minutos, 5,6 minutos e 8,4 minutos apresentando degradação de aproximadamente 25 % para oxa (**Figura 24**).

Para a degradação oxidativa as degradações de oxa foi de 17 % (**Figura 25**) com o surgimento do pico de peróxido de hidrogênio em $t_r = 1,3$ minutos.

Para todas as outras amostras houve aparecimento de possíveis picos de degradação nos $t_r = 3,8$ minutos e 5,6 minutos com porcentagem de degradação variada para a oxamniquina. A amostra submetida a hidrólise básica apresentou degradação de 10 % (**Figura 26**); amostra submetida a degradação neutra apresentou degradação de 11 % (**Figura 27**); amostra submetida a fotólise obteve respostas de 7 % para oxa (**Figura 28**); a análise das amostras submetidas ao calor apresentou degradação de 3% para oxa (**Figura 29**).

A resolução entre os picos dos possíveis degradantes e os picos principais foi satisfatória (Rs 1,5).

5.3.2. Linearidade

Para avaliação da linearidade da metodologia proposta, foram preparadas amostras em diferentes níveis de concentração conforme **Tabela 09**, utilizando 3 replicatas de cada nível para a composição da curva de calibração.

Os dados obtidos estão na **Tabela 14**.

Tabela 14 - Oxamniquina: valores de área obtidos - linearidade

Concentração	Área 1 ^a injeção (mAU)	Área 2 ^a injeção (mAU)	Área 3 ^a injeção (mAU)	Área Média (mAU)	DPR (%)
80 (p/v)	97,201	97,399	97,093	97,231	0,15961
90 (p/v)	107,983	108,076	108,221	108,093	0,11096
100 (p/v)	120,307	120,674	120,599	120,527	0,16088
110 (p/v)	132,561	132,772	132,798	132,71	0,09794
120 (p/v)	145,201	145,34	145,789	145,443	0,2113

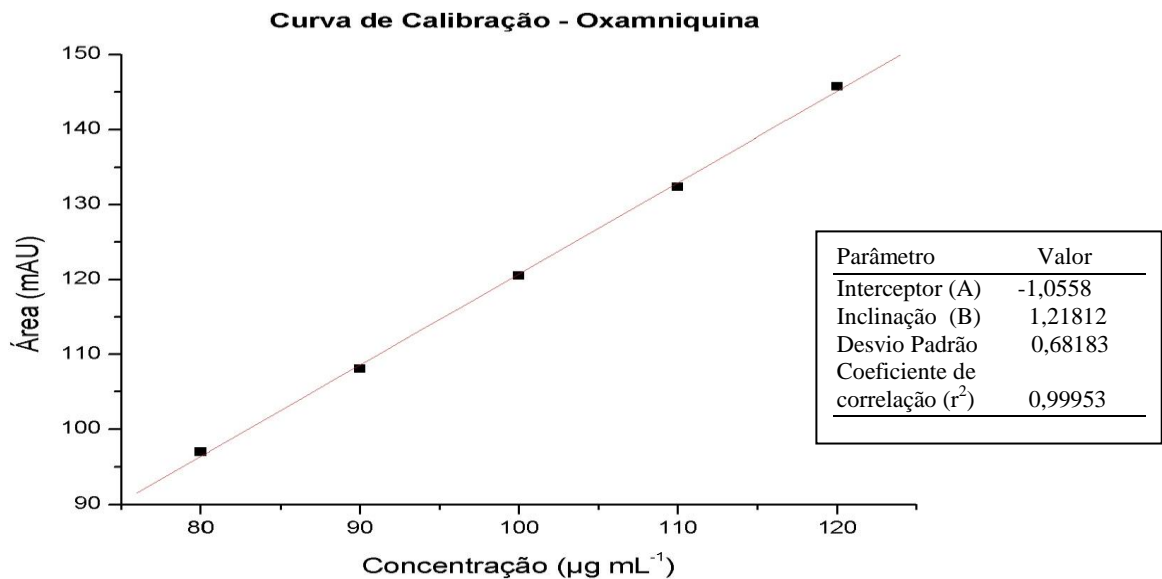
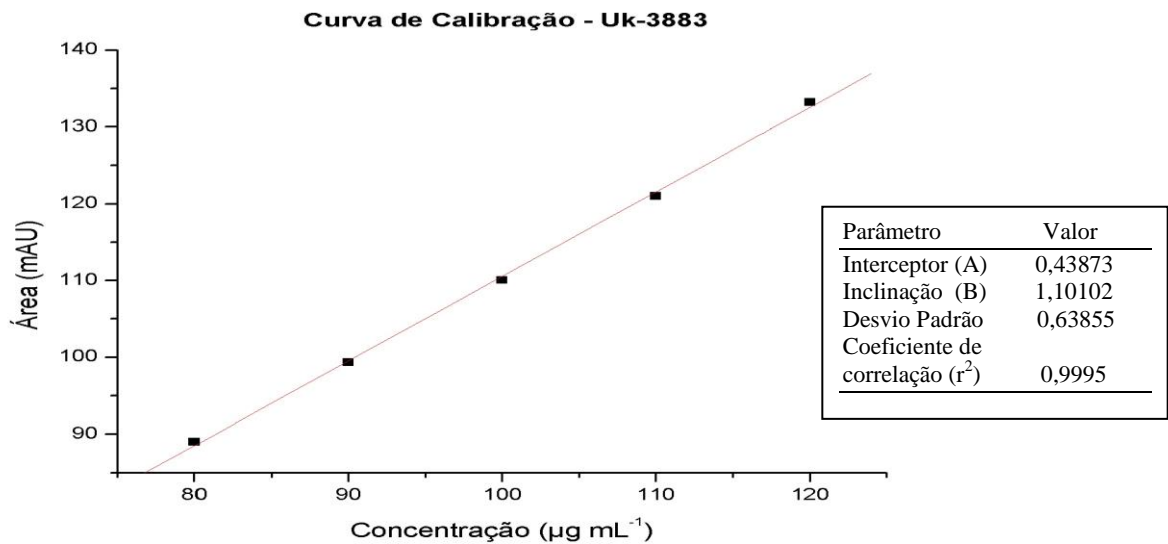


Figura 30. Curva analítica resultante da análise da solução padrão de Oxamniquina utilizando HPLC

Tabela 15 - Uk-3883: valores de área obtidos - linearidade

Concentração	Área 1ª injeção (mAU)	Área 2ª injeção (mAU)	Área 3ª injeção (mAU)	Área Média (mAU)	DPR (%)
80 (p/v)	88,997	89,012	89,213	89,074	0,13541
90 (p/v)	99,011	99,114	99,239	99,1213	0,11519
100 (p/v)	110,122	110,289	110,369	110,26	0,1143
110 (p/v)	120,899	121,089	121,217	121,068	0,13216
120 (p/v)	133,01	133,428	133,786	133,408	0,29113

**Figura 31.** curva analítica resultante da análise da solução padrão de Uk-3883 utilizando HPLC

Os resultados obtidos na linearidade nas faixas de concentração trabalhadas indicam coeficiente de correlação acima de 0,99 e apresentam uma relação linear de x e y nas curvas analíticas de oxamniquina (figura 30) e de uk-3883 (figura 31), indicando uma pequena dispersão do conjunto de pontos experimentais, confirmada pela DPR < 2,0% entre as concentrações trabalhadas.

5.3.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram estimados através da curva analítica construída com os resultados obtidos no teste de linearidade conforme tabela 16:

Tabela 16 - Resultados de LD e LQ de Oxamniquina e de Uk-3883

	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Oxamniquina	Uk-3883
LD	1,85	1,91
LQ	5,59	5,79

5.3.4. Precisão

A precisão foi calculada pelo desvio padrão relativo (DPR%) entre as 6 determinações na concentração do nominal do método proposto. De acordo com a RE 899 da ANVISA, não se admitem valores superiores a 5%. Para ambos os analitos foram observadas variações (DPR) menores que 2% dentre as replicas avaliadas o que indica que o método analítico é repetitivo (**Tabela 17**).

Tabela 17 - Resultados relativos ao ensaio de precisão

	Oxamniquina		uk-3883	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
injeção 1	118,98	122,314	109,483	110,787
injeção 2	119,897	120,412	108,987	111,983
injeção 3	119,287	121,831	108,782	112,093
injeção 4	120,385	120,784	107,983	111,846
injeção 5	119,981	122,059	110,484	112,984
injeção 6	121,006	121,483	109,984	112,312
média	119,9227	121,4805	109,2838	112,0008
DPR (%)	0,610962	0,6137	0,818691	0,640071

5.3.5. Precisão intermediária

A **Tabela 18** apresenta os resultados obtidos na determinação da precisão intermediária. Observa-se que o desvio-padrão relativo (%DPR) das áreas dos picos foi menor que 2%, portanto a precisão de injeção foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação³⁸.

Tabela 18 – Resultados obtidos nas determinações de precisão intermediária - CE

	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão intermediária (%DPR)
Oxa	80,0	0,38
	100,0	0,22
	120,0	0,24
Uk	80,0	0,88
	100,0	0,61
	120,0	0,31

5.3.6. Exatidão

A exatidão do método por HPLC foi determinada pelo teste de recuperação, em três níveis de concentração. A recuperação média encontrada para a oxamniquina foi de 101,22% e para uk-3883 foi de 99,76%, indicando assim boa correspondência entre as quantidades adicionadas ao placebo de solução padrão e as quantidades recuperadas. A tabela 18 mostra os resultados para o teste de recuperação para os fármacos estudados.

Tabela 19 - Resultados obtidos na determinação da recuperação do método específico por HPLC

Padrão	Quantidade de padrão adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Quantidade de padrão recuperado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação * (%)	Média (%)
Oxamniquina	80	81,3	101,63	101, 22
	100	102,14	102,14	
	120	119,86	99,88	
Uk-3883	80	79,73	99,66	99,76
	100	99,83	99,83	
	120	119,74	99,78	

* Média de três determinações

5.4 Metodologia analítica desenvolvida por eletroforese capilar

5.4.1. Testes preliminares

Com a finalidade de padronizar uma metodologia eficiente para análises de identificação e quantificação de oxamniquina pelo CE, alguns testes preliminares foram realizados para a escolha de comprimento de onda adequado, assim como solução tampão, concentração do eletrólito. Também foram ajustadas as condições de análise, ou seja, os parâmetros variáveis do equipamento.

Foi utilizado inicialmente, solução de fosfato de sódio monobásico com concentração de 25 mmol L^{-1} sendo seu pH ajustado para 2,5 com solução de ácido fosfórico 1N. Durante os testes preliminares foram testados as concentrações do eletrólito (30 mmol L^{-1} , 35 mmol L^{-1} e 40 mmol L^{-1}).

5.4.1.1. Verificação de comprimento de onda adequado

Foram trabalhados inicialmente os comprimentos de onda conforme resultados obtidos no espectro de varredura por espectrofotômetro. Assim, os comprimentos de onda trabalhados foram: 205 nm e 245 nm (**Figuras 32 e 33**, respectivamente).

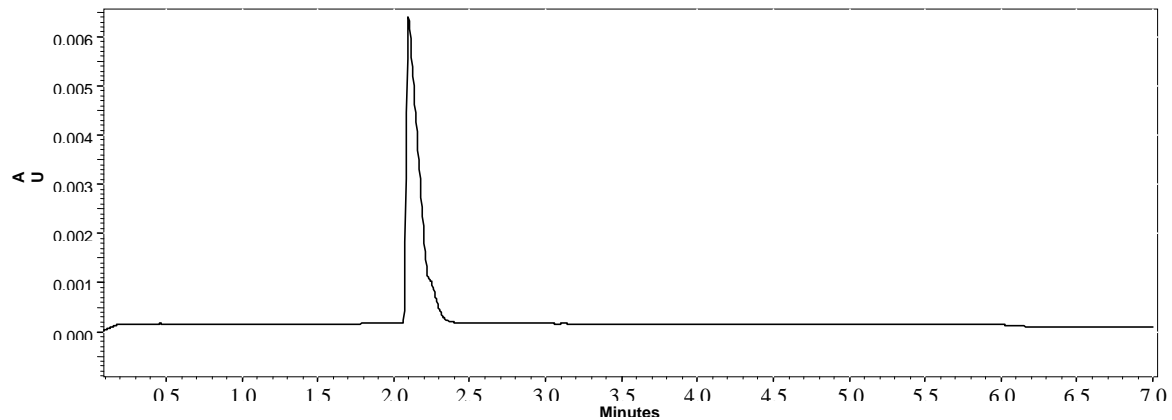


Figura 32. Eletroferograma da solução padrão de oxamniquina $100,0 \mu\text{g/mL}$ por CZE Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 25 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido ortofosfórico, Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , detecção UV em 205 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s.

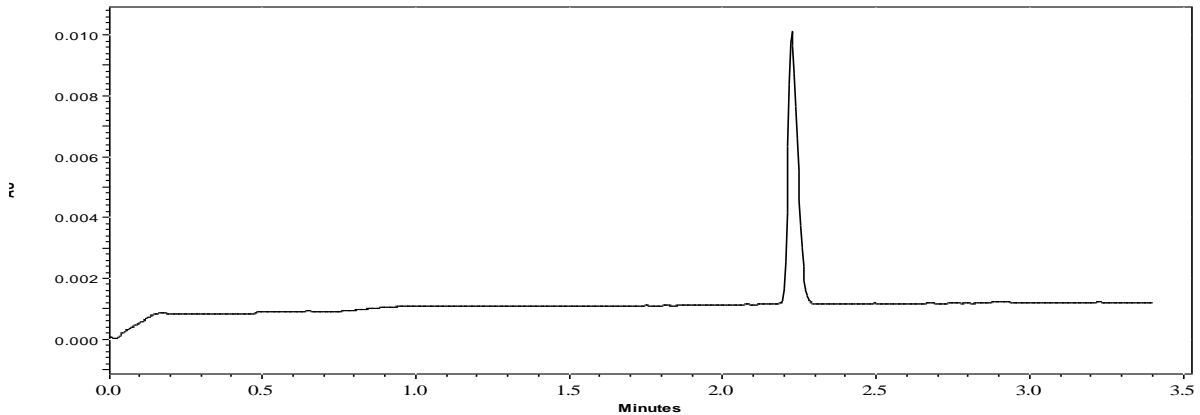


Figura 33. Eletroferograma da solução padrão de oxamniquina 100,0 $\mu\text{g/mL}$ Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 25 mmol.L^{-1} , $\text{pH}= 2,5$ ajustado com ácido orto-fosfórico, Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x 50 μm d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C, detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s.

Avaliando os eletroferogramas obtidos, foi verificado que no comprimento de onda de 254 nm ocorre a maior absorção no UV (**Figura 33**), portanto, foi escolhido este comprimento de onda para o desenvolvimento deste trabalho.

5.4.1.2. Verificação de concentração de eletrólito adequado

Foram realizados testes com a solução padrão de oxamniquina para avaliar a concentração da solução de fosfato de sódio monobásico a ser empregada como concentração de trabalho para o desenvolvimento da metodologia. Foram testadas as concentrações seguintes concentrações de eletrólitos: 25 mmol L^{-1} , 30 mmol L^{-1} , 35 mmol L^{-1} , e 40 mmol L^{-1} . As figuras 34 a 37 mostram os resultados obtidos.

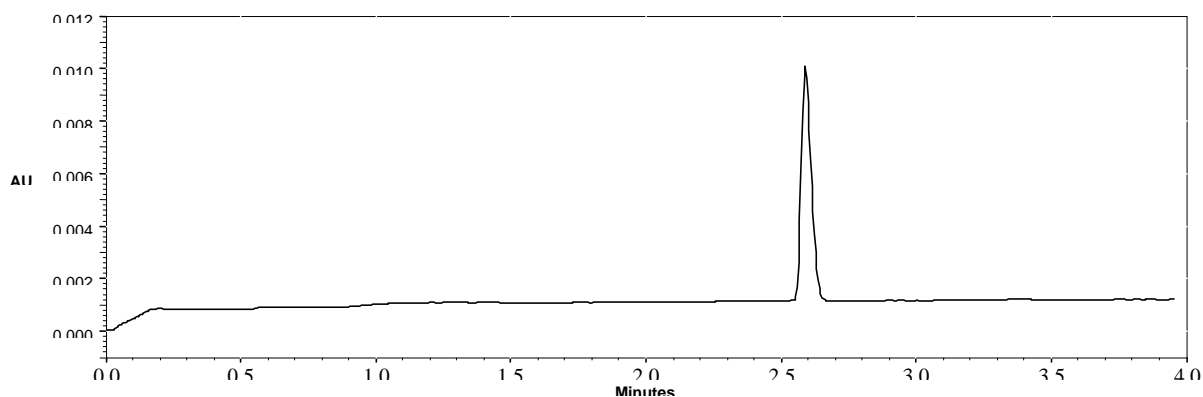


Figura 34. Eletroferograma da solução padrão de oxamiquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 25 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 205 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s.

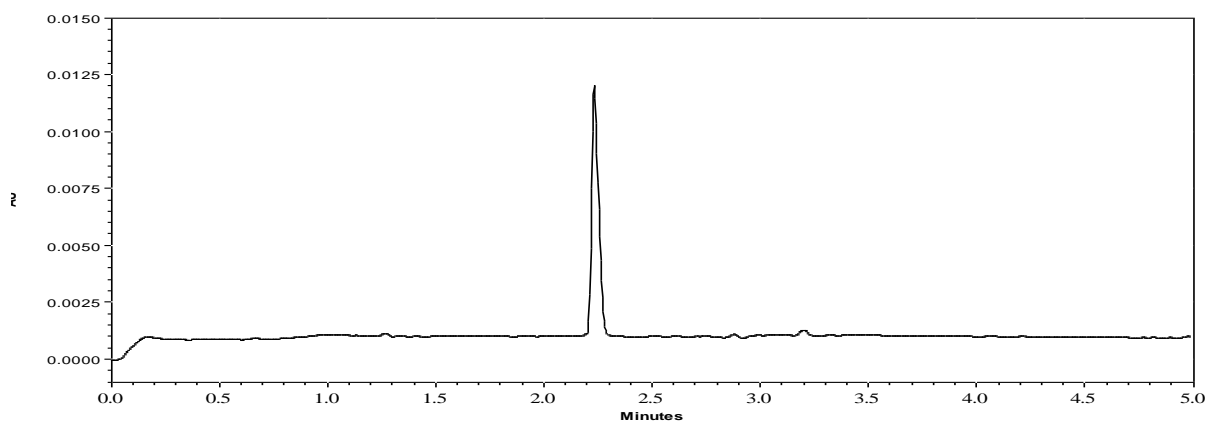


Figura 35. Eletroferograma da solução padrão de oxamiquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s.

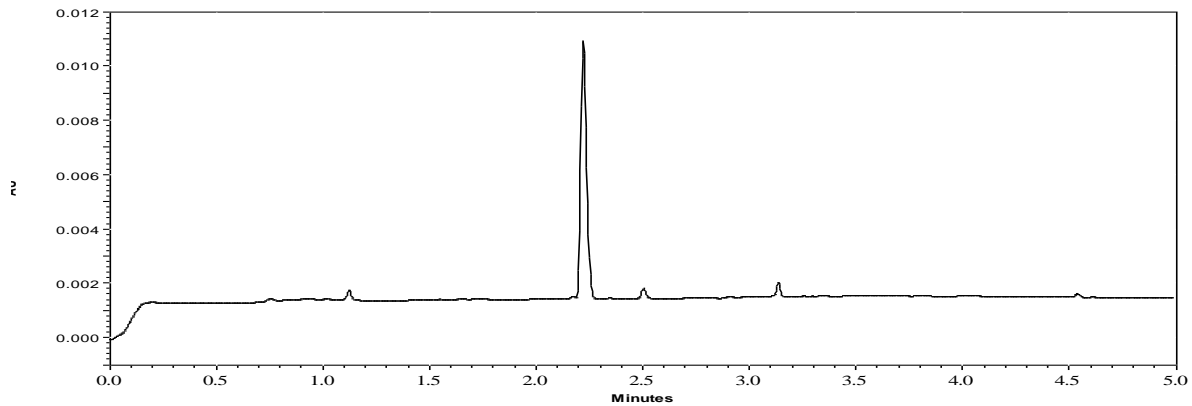


Figura 36. Eletroferograma da solução padrão de oxamiquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condições: f eletrólito: fosfato de sódio monobásico 35 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s.

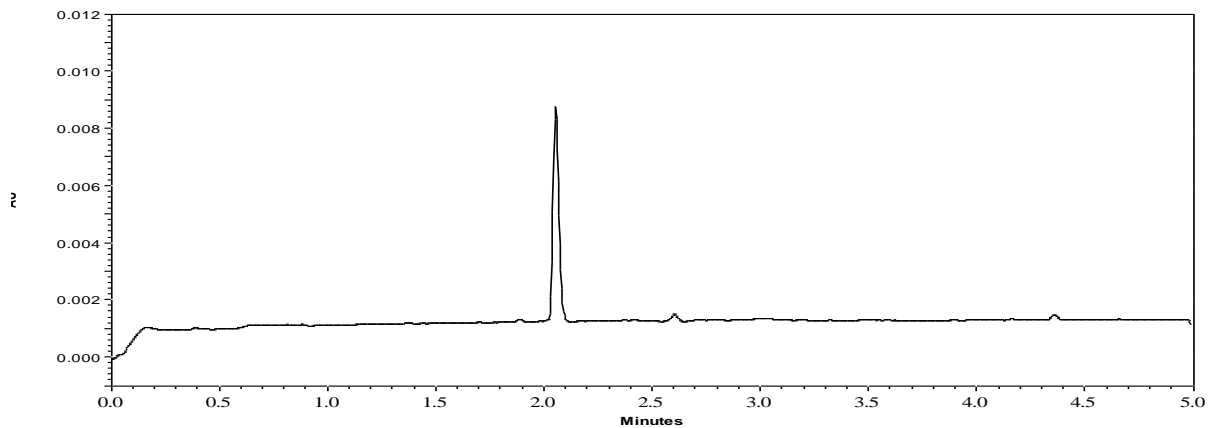


Figura 37. Eletroferograma da solução padrão de oxamiquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 40 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s.

Avaliando os eletroferogramas obtidos, foi verificado que a concentração da solução de fosfato de sódio monobásico a 30 mmol L^{-1} com pH ajustado a 2,5 (**Figura 34**) apresentou uma banda melhor definida e com menor corrente, assim, foi escolhida esta concentração de fosfato de sódio monobásico para o prosseguir o trabalho.

Quanto ao tempo de migração, não foi verificada diferença significativa. Observa-se nas **Figuras 35 e 36** que o tempo de migração foi em torno de 2,3 minutos e na **Figura 37** foi aproximadamente 2,1 minutos.

5.4.1.3. Escolha do padrão interno

Em eletroforese capilar faz-se necessário a utilização de um padrão interno para diminuir as flutuações do volume de injeção da amostra e evitar mudanças nas alturas ou áreas dos picos durante as corridas obtendo-se assim uma melhor precisão. É indicado a escolha de um padrão interno que não tenha tempo de migração no mesmo tempo do analito de interesse, oxamniquina^{40,43}.

Para a eleição de padrão interno foram utilizadas as seguintes substâncias: atenolol, cefalexina e clozapina. Todas as soluções foram preparadas com concentração de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol.

Segue os eletroferogramas obtidos com as soluções padrões das substâncias para a escolha do padrão interno.

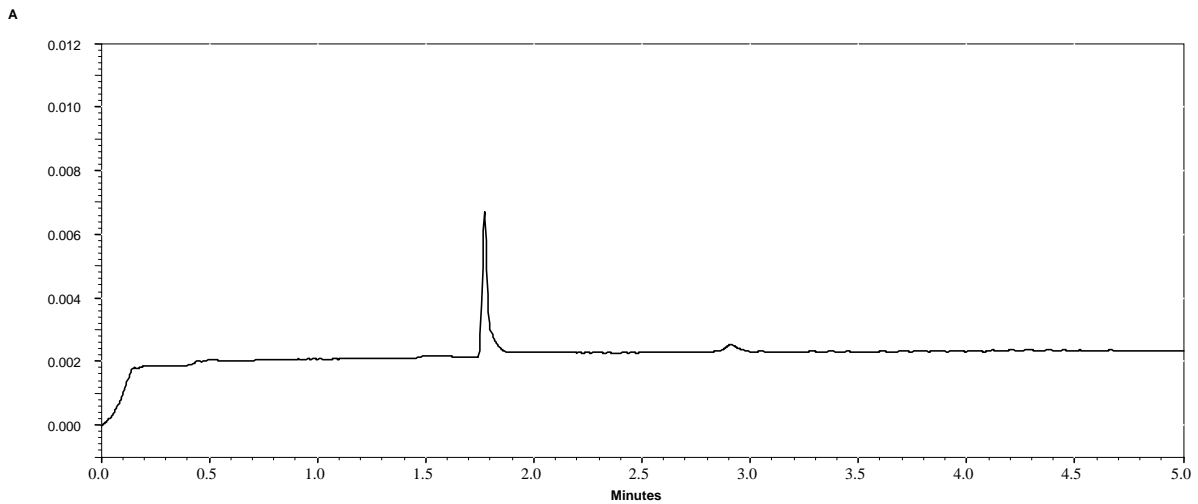


Figura 38. Eletroferograma da solução padrão de atenolol $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (p.i) Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s.

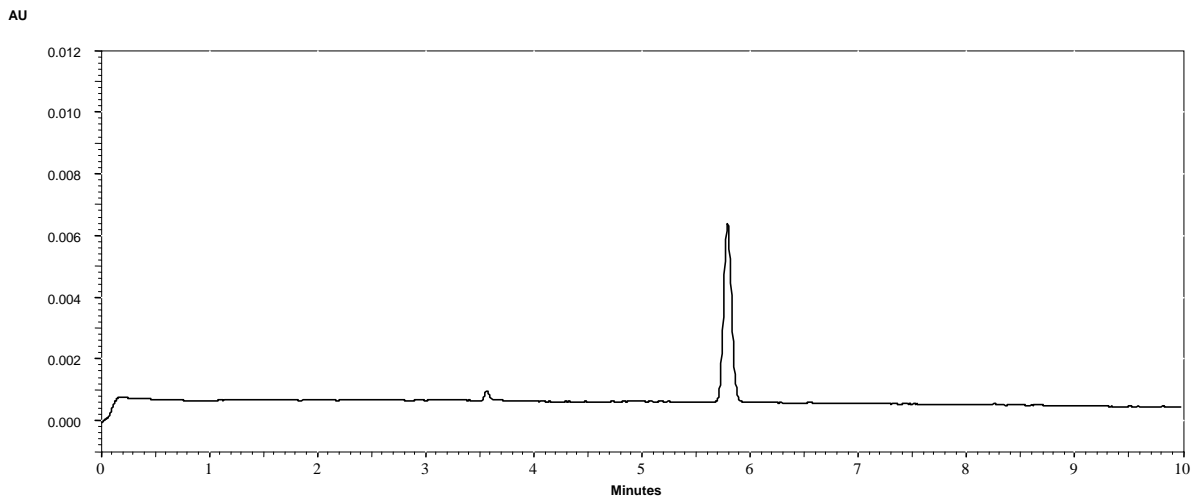


Figura 39. Eletroferograma da solução padrão de cefalexina $100,0 \mu\text{g/mL}$ (p.i) Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s.

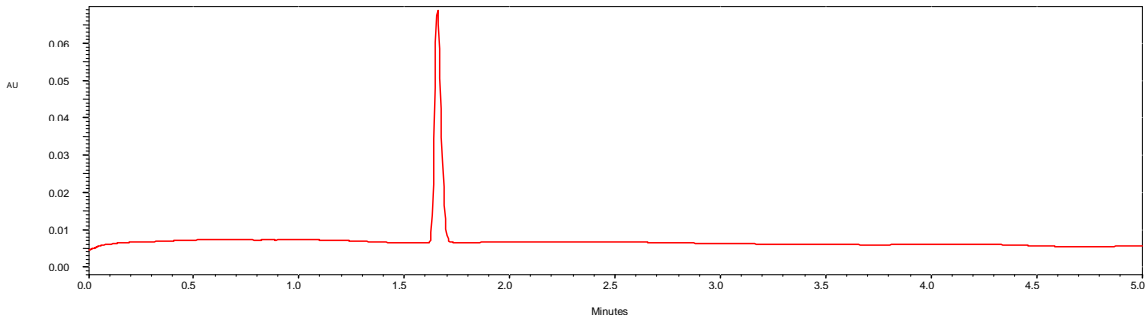


Figura 40. Eletroferograma da solução padrão de clozapina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (p.i) Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico 10%. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s.

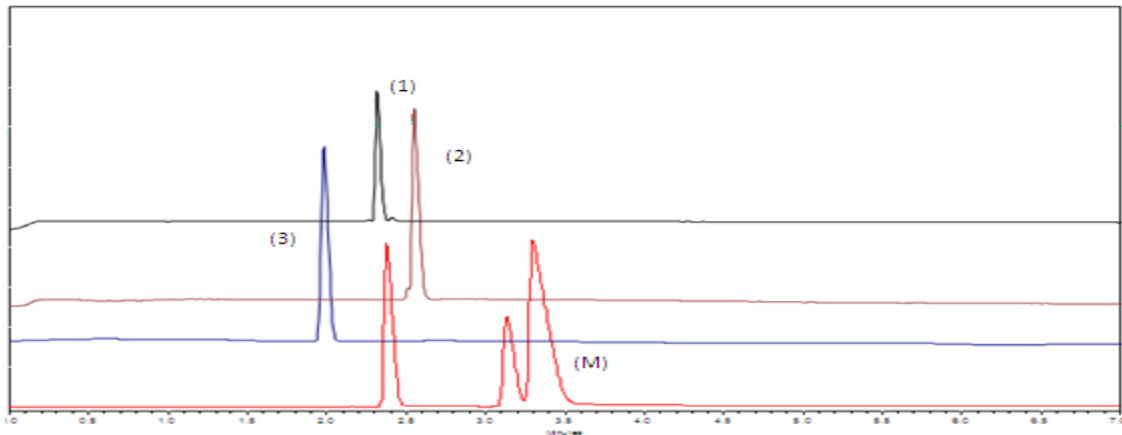


Figura 41. Eletroferogramas da solução padrão (M) contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e clozapina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; solução padrão de uk-3883 (1) $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; solução padrão de oxamniquina (2) $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e solução padrão de clozapina (3) $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por CZE. Condições: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s.

Dentre as substâncias testadas como possíveis padrões internos, a clozapina apresentou-se como a mais adequada, pois não ocorreu interferência com a oxamniquina e seu pico sai logo no início da corrida, não prolongando a análise.

Efeito do aditivo orgânico na separação dos analitos

Para melhorar a resolução entre os picos de oxamniquina e uk-3883 foram testados algumas concentrações de MeOH como modificador orgânico adicionado ao eletrólito de corrida.

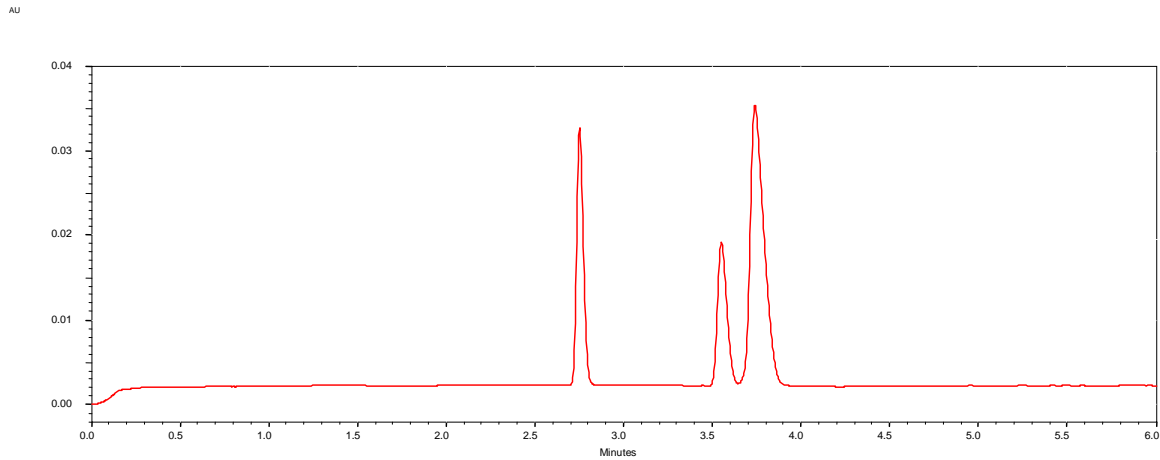


Figura 42. Eletroferograma da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 10% de metanol . Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., tensão aplicada +20 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi/3s.

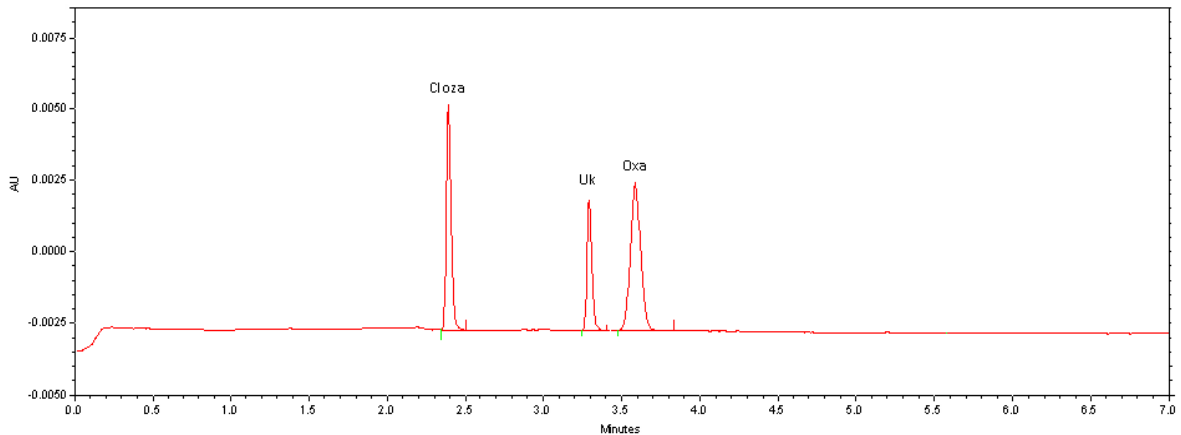


Figura 43. Eletroferograma da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , $\text{pH} = 2,5$ ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector $\times 50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada $+25 \text{ kV}$, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão $0,5\text{psi}/3\text{s}$.

A adição do solvente orgânico metanol ao eletrólito de trabalho na concentração de 20% proporcionou uma resolução satisfatória ($\geq 1,5$) entre a oxamniquina e o uk-3883.

Quadro 3 - Resultados de adequabilidade do sistema - CE

Parâmetros	Clozapina \pm DPR	Oxamniquina \pm DPR	Uk – 3883 \pm DPR
Tempo de migração (minutos)	$2,401 \pm 1,5$	$3,334 \pm 1,8$	$3,569 \pm 1,9$
Área dos picos (A)	$19491 \pm 3,2$	$120,526 \pm 3,7$	$110,073 \pm 4,1$
Nº de pratos	$106407 \pm 13,4$	$104233 \pm 10,5$	$99728 \pm 11,1$
Resolução	-----	2,6	1,7
Assimetria	$1,0 \pm 2,8$	$1,1 \pm 3,4$	$1,3 \pm 4,5$

Assim, o método analítico desenvolvido teve as seguintes condições cromatográficas determinadas:

Quadro 4 – Parâmetros das condições de trabalho - CE

Tampão	Fosfato de sódio monobásico 30 mmol L ⁻¹
Modificador orgânico	MeOH 18%
pH	2,5
Potencial	25 kV
Temperatura	20 °C
Pressão de injeção	0,5 psi
Tempo de injeção	3s
Tamanho do capilar	30 cm de comprimento total

5.5 Validação do método por CE

5.5.1. Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através dos testes de estresse aplicados ao padrão e a amostra comercial de Mansil a fim de conhecer o comportamento químico do ativo sob diferentes condições.

As amostras foram submetidas a condições de estresse por hidrólise ácida, alcalina, neutra e oxidativa pelo período de 7 dias (168 horas) sobre temperatura controlada de $80 \pm 0,5$ °C; degradação térmica (60°C) das amostras secas por 24 horas e fotolítica por um período de 60 horas. Em seguida as amostras foram preparadas e avaliadas através do método proposto para a técnica de CE.

O objetivo desta avaliação é observar a formação de produtos de degradação que interfiram na determinação de oxamniquina.

Na **Tabela 19** encontram-se os valores obtidos após as condições de estresse da solução trabalho de oxamniquina e uk-3883.

Tabela 20 - Resultados obtidos após condições de estresse da solução padrão de trabalho – Oxamniquina e Uk-3883

Condição		% de resposta em relação a condição não estressada - padrões de trabalho						
		Clozapina	Oxamniquina		Uk-3883			
		Área	Área	Razão	%	Área	Razão	%
Tempo 0		13432	16781	1,249	100,00	15582	1,160	100,00
Hidrólise ácida	7 dias	17243	15734	0,913	73,04	13593	0,788	67,95
hidrólise básica		18720	21090	1,127	90,18	19307	1,031	88,91
Hidrólise oxidativa		21091	21768	1,032	82,61	19039	0,903	77,82
Hidrólise neutra		15909	17555	1,104	88,32	16092	1,012	87,19
Fotólise		18923	21783	1,151	92,14	19612	1,036	89,34
Térmica		21092	24543	1,164	93,14	22698	1,076	92,77

Nas **Figuras 44**, podemos observar os eletroferogramas referentes a análise que avaliou o estresse da solução padrão de oxamniquina e uk-3883, onde a presença dos picos de degradação não interfere nos picos de interesse.

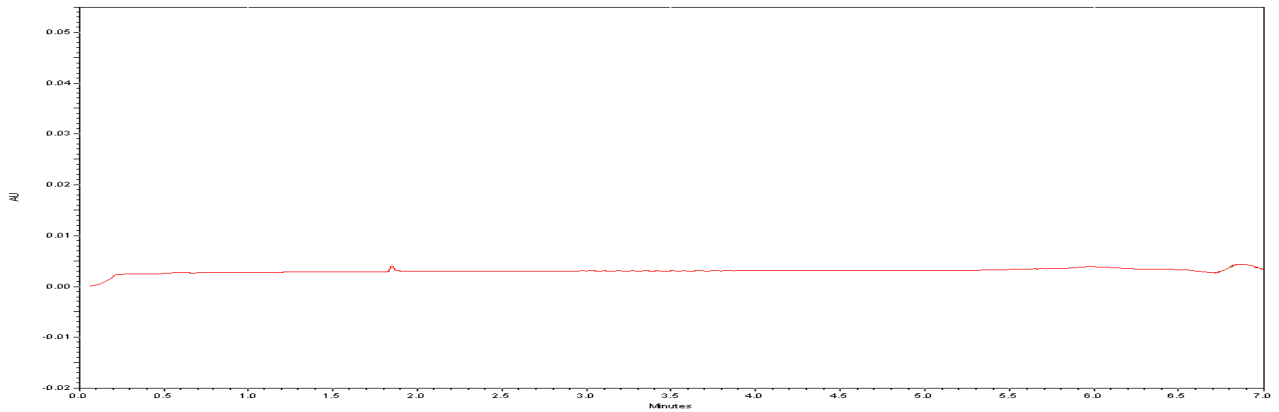


Figura 44. Eletroferograma do eletrólito. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L-1, pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x 50 μm d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s.

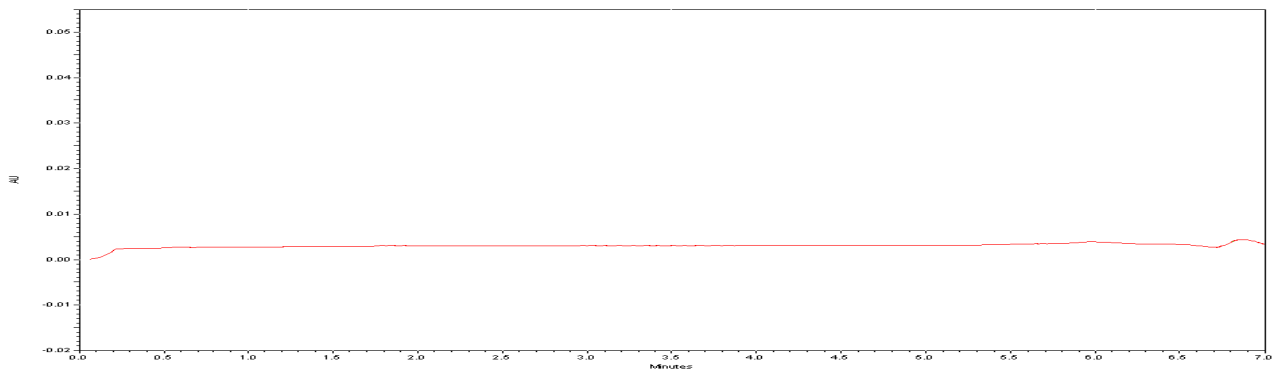


Figura 45. Eletroferograma da solução placebo. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L-1, pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x 50 μm d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C, Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s.

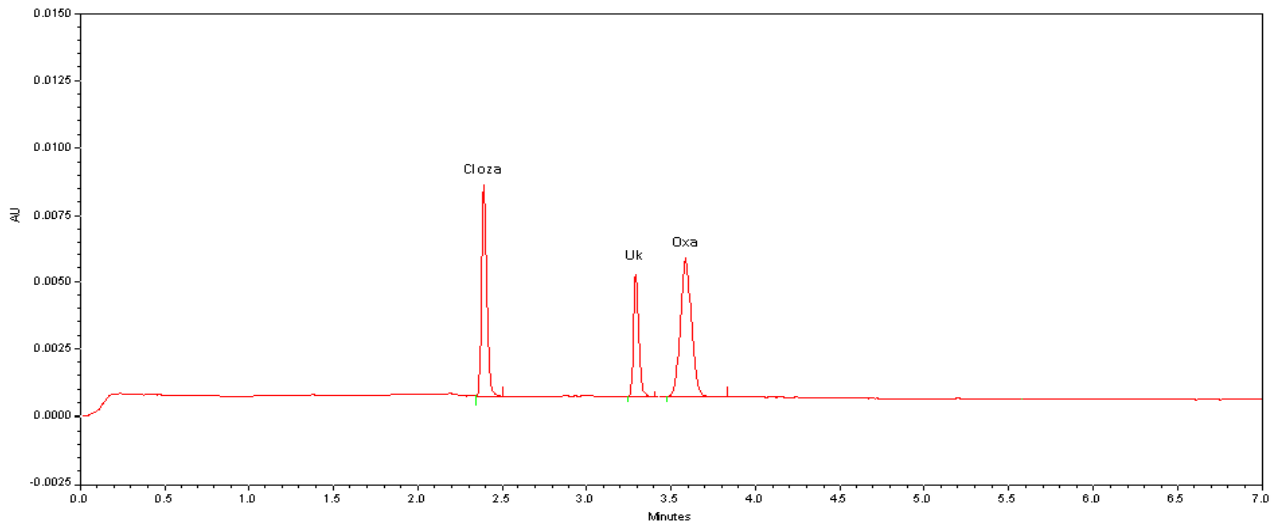


Figura 46. Eletroferograma da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: Tempo, 0 horas. Eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s.

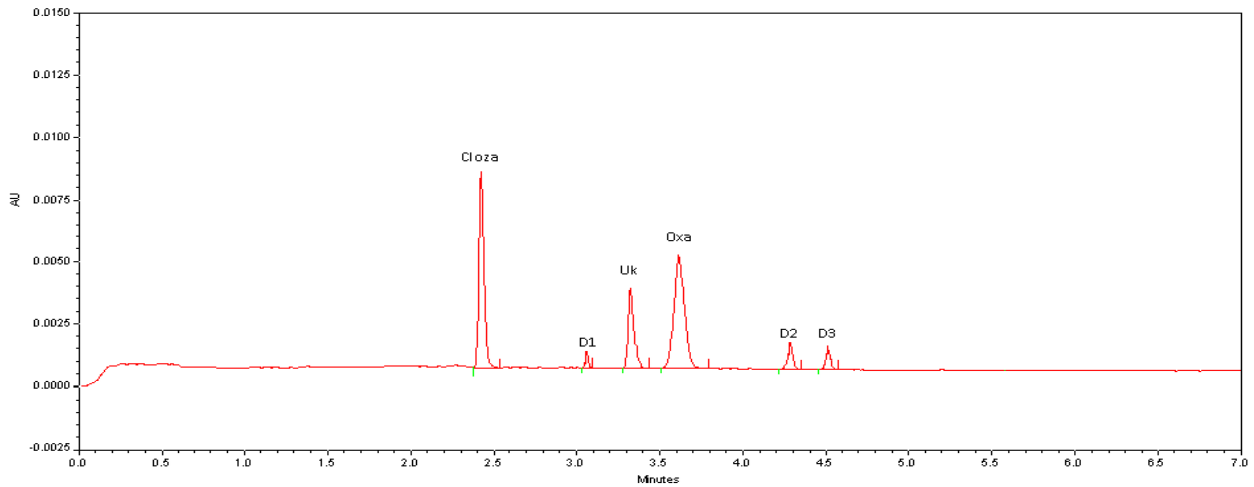


Figura 47. Eletroferograma obtido após hidrólise ácida da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: HCl 1 mmol L^{-1} /7 dias. Eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s.

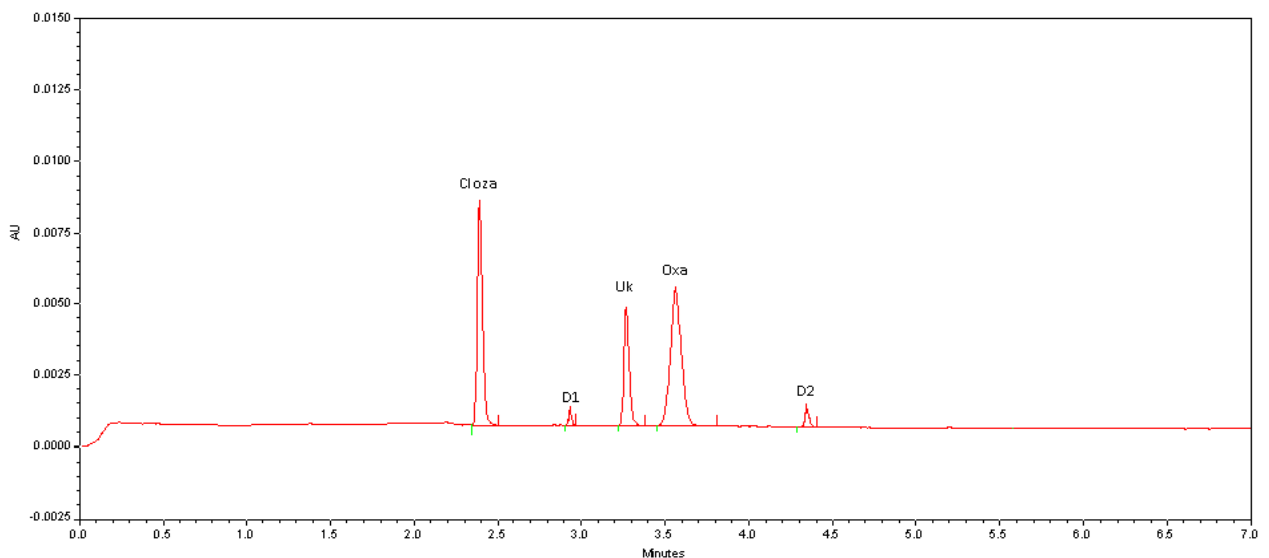


Figura 48. Eletroferograma obtido após hidrólise básica da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: NaOH 1 mmol L^{-1} / 7 dias eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s.

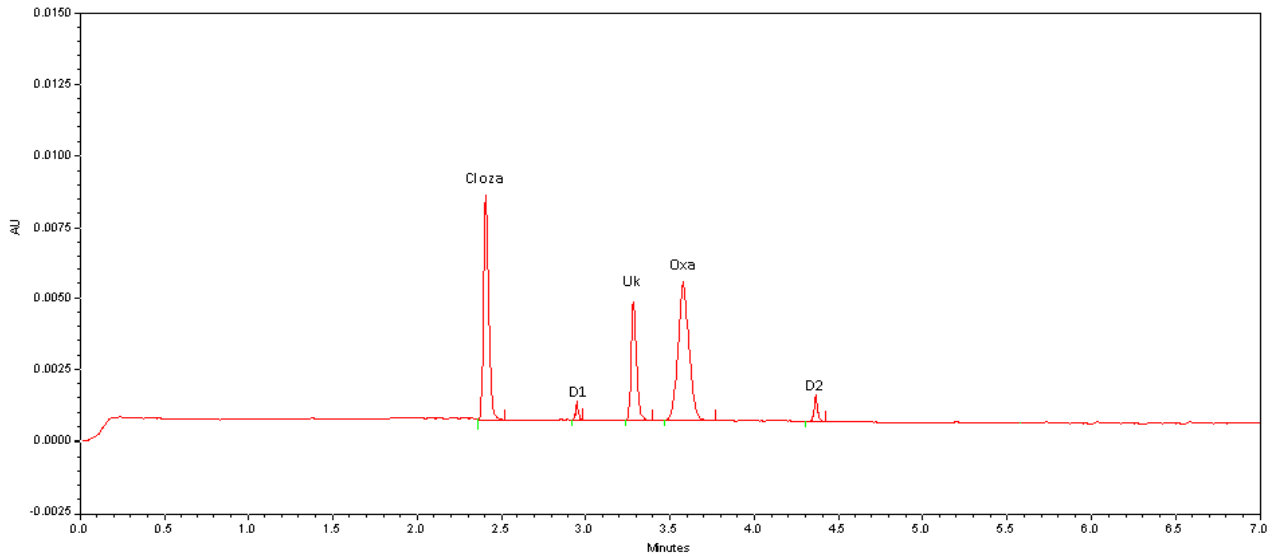


Figura 49. Eletroferograma obtido após hidrólise neutra da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: $80 \text{ }^\circ\text{C}/7$ dias eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , $\text{pH}= 2,5$ ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector $\times 50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada $+25 \text{ kV}$, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão $0,5\text{psi}/3\text{s}$.

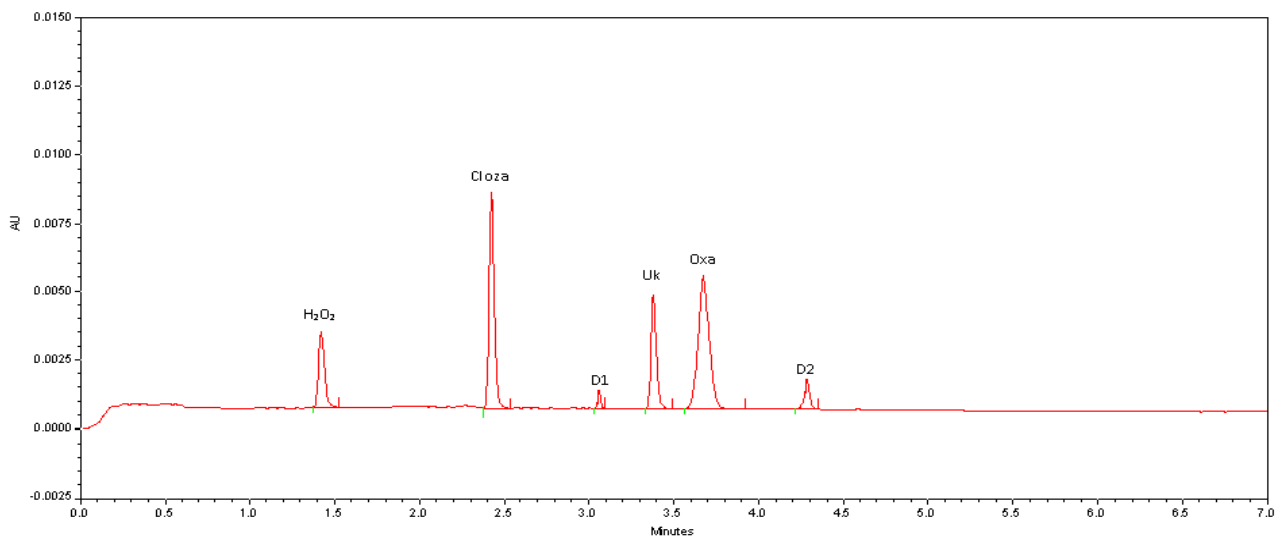


Figura 50. Eletroferograma obtido após estresse oxidativo da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: H_2O_2 3% / 7 dias eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , $\text{pH}= 2,5$ ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector $\times 50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada $+25 \text{ kV}$, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão $0,5\text{psi}/3\text{s}$.

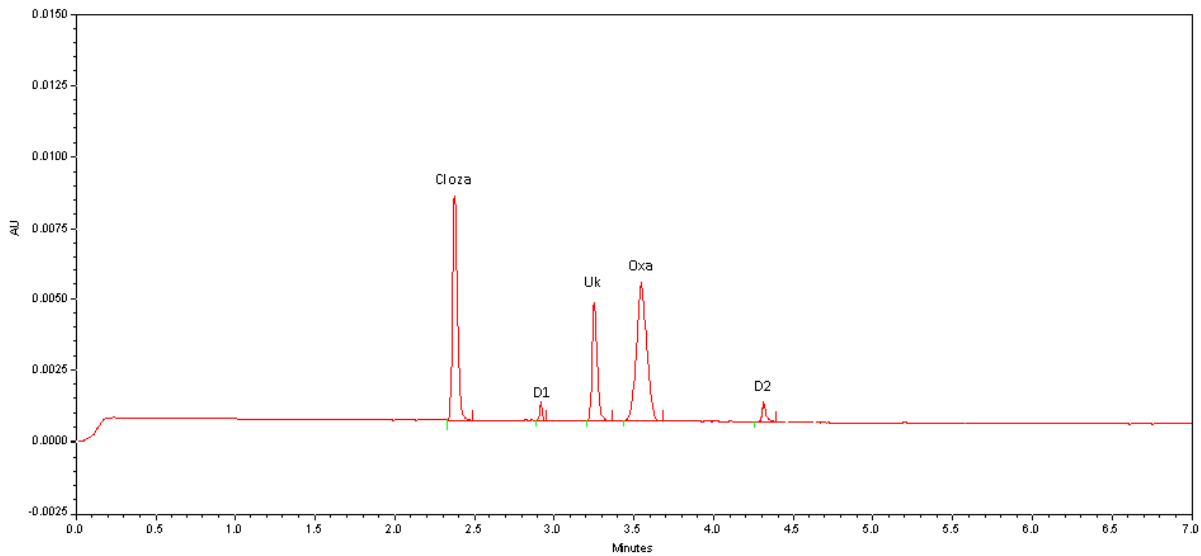


Figura 51. Eletroferograma obtido após estresse por fotólise da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s.

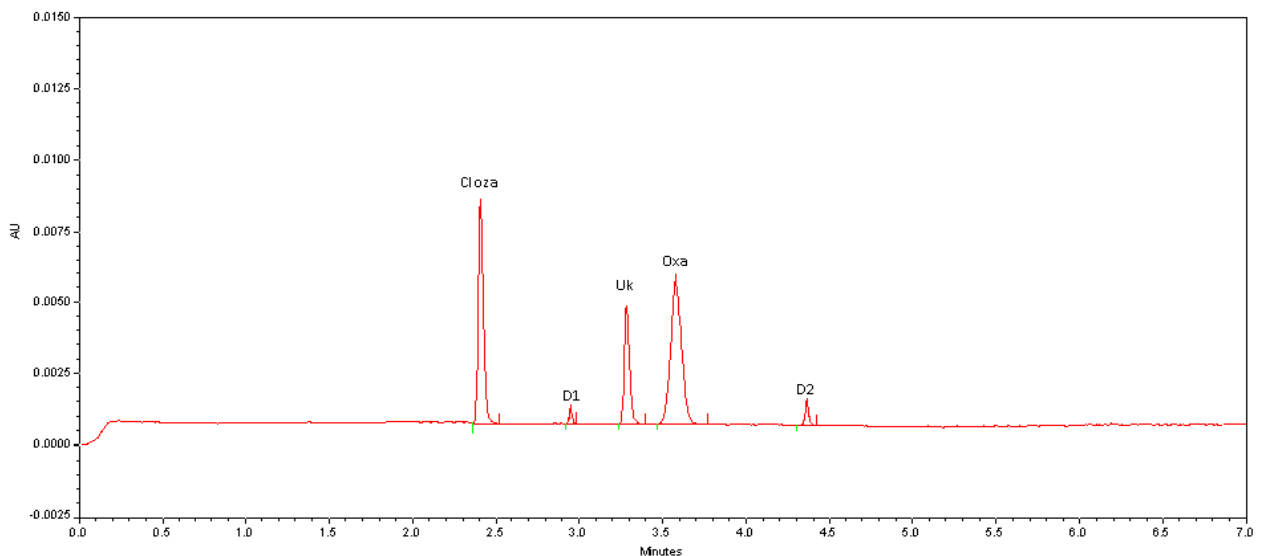


Figura 52. Eletroferograma obtido após estresse térmico da solução padrão contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, uk-3883 $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: 60°C / 7 dias eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s.

Na **Tabela 21** encontram-se os valores obtidos após as condições de estresse da solução amostra comercial.

Tabela 21 - Resultados obtidos após condições de estresse da solução amostra comercial Mansil

Condição		% de resposta em relação a condição não estressada - amostra comercial			
		Clozapina	Oxamniquina	Razão	%
		Área	Área		
Tempo 0		13264	16678	1,257	100
Hidrólise ácida	7 dias	16983	15634	0,921	73,21
hidrólise básica		15039	16729	1,112	88,47
Hidrólise oxidativa		18302	18498	1,0108	80,38
Hidrólise neutra		22109	23909	1,081	86,00
Fotólise		19023	22331	1,174	93,36
Térmica		23317	27922	1,198	95,27

Nas **Figuras 53, 54, 55, 56, 57** e podemos observar os eletroferogramas referentes à análise que avaliou o estresse da solução amostra comercial de Mansil, onde a presença dos picos de degradação não interfere nos picos de interesse.

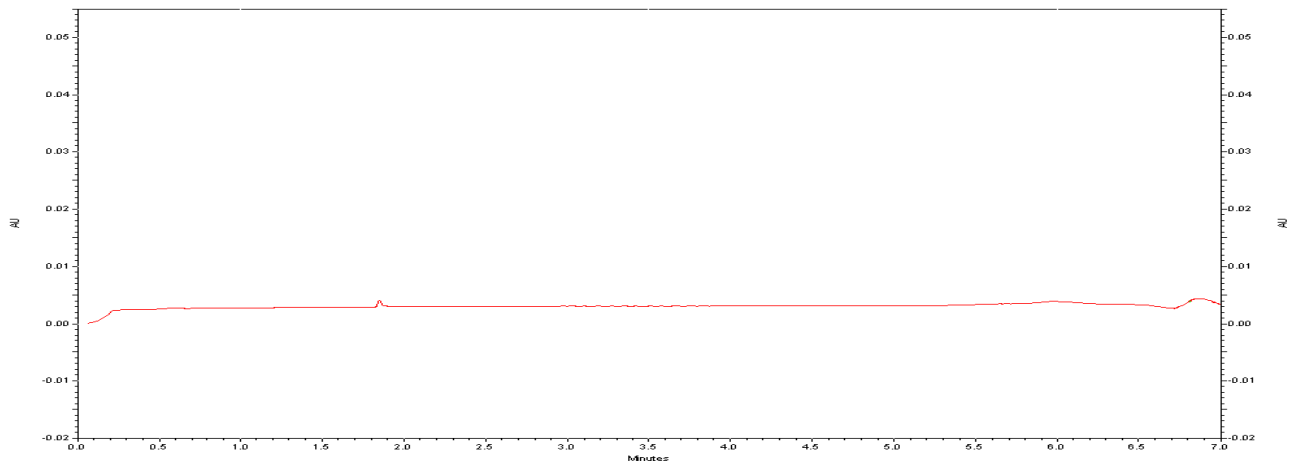


Figura 53. Eletroferograma da solução placebo. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , $\text{pH} = 2,5$ ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector $\times 50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s.

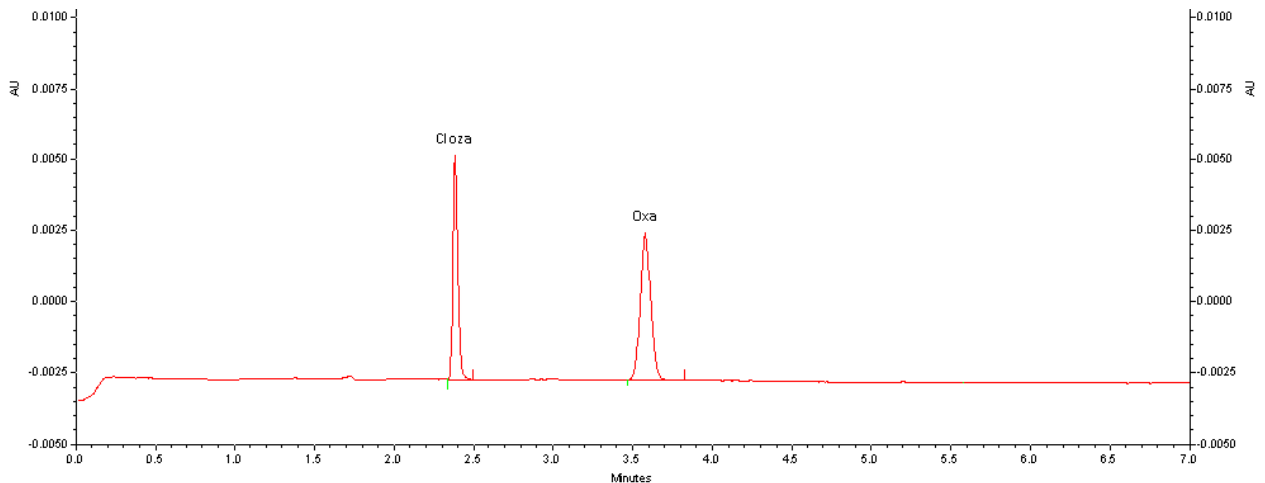


Figura 54. Eletroferograma da solução amostra comercial contendo oxamiquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: Tempo 0 horas. Eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , $\text{pH} = 2,5$ ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector $\times 50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s.

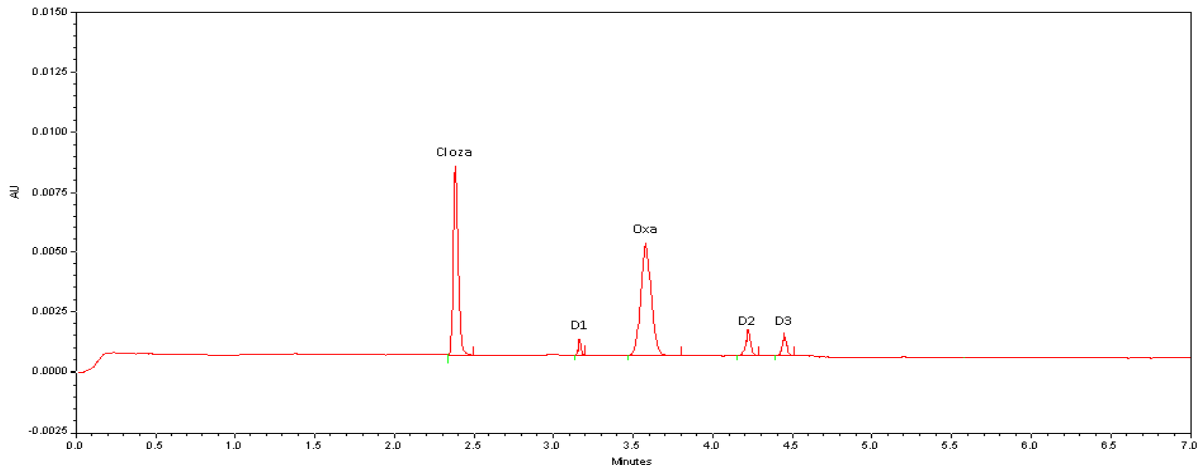


Figura 55. Eletroferograma obtido após hidrólise ácida da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: HCl 1 mmol L^{-1} . Eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s.

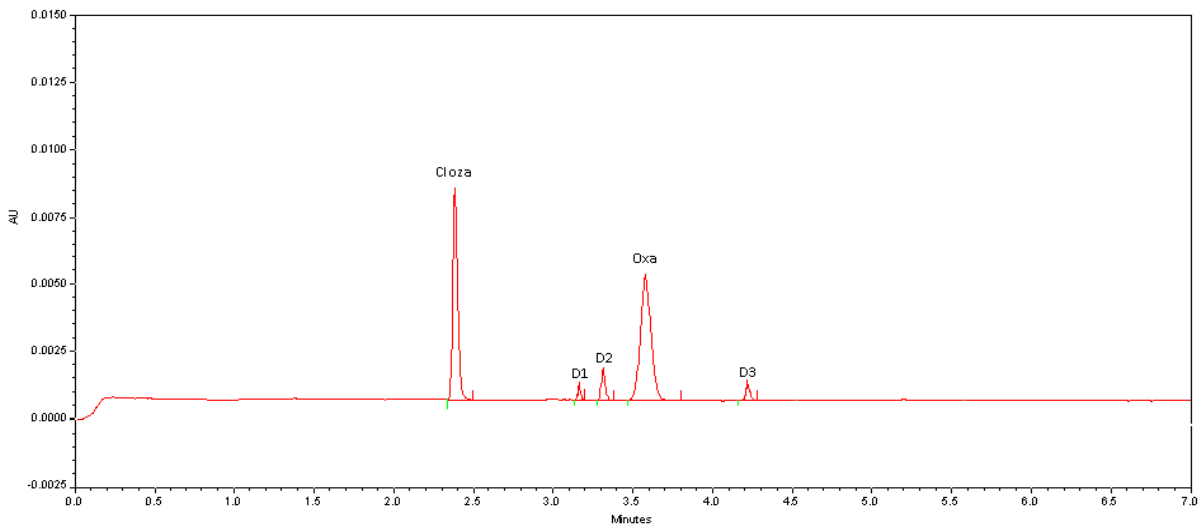


Figura 56. Eletroferograma obtido após hidrólise básica da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: NaOH 1 mmol L^{-1} . Eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , pH= 2,5 ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s.

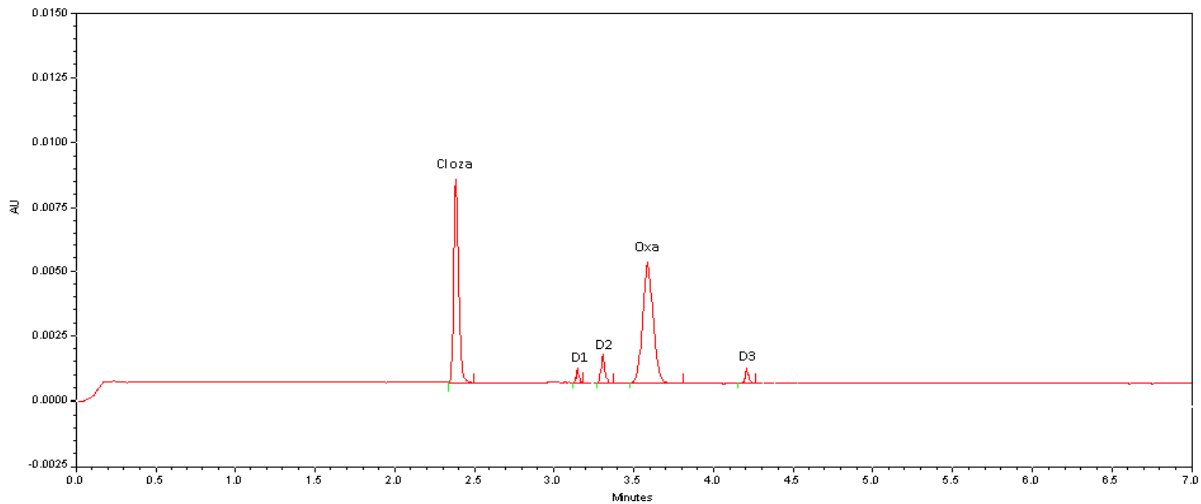


Figura 57. Eletroferograma obtido após hidrólise neutra da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: 80°C / 7 dias. Eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , $\text{pH} = 2,5$ ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada $+25 \text{ kV}$, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}/3\text{s}$.

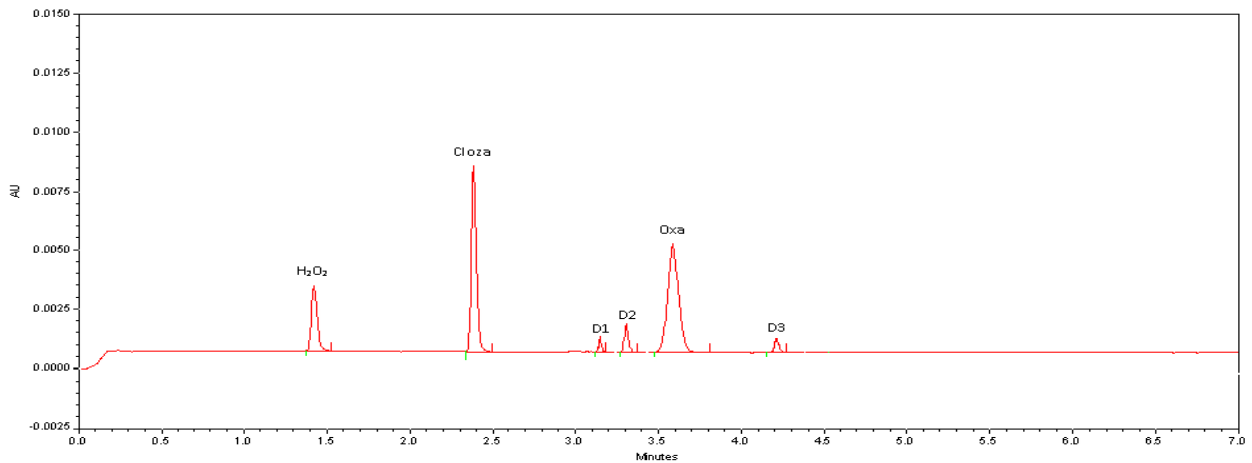


Figura 58. Eletroferograma obtido após estresse oxidativo da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: H_2O_2 3% / 7 dias eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , $\text{pH} = 2,5$ ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector x $50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada $+25 \text{ kV}$, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}/3\text{s}$.

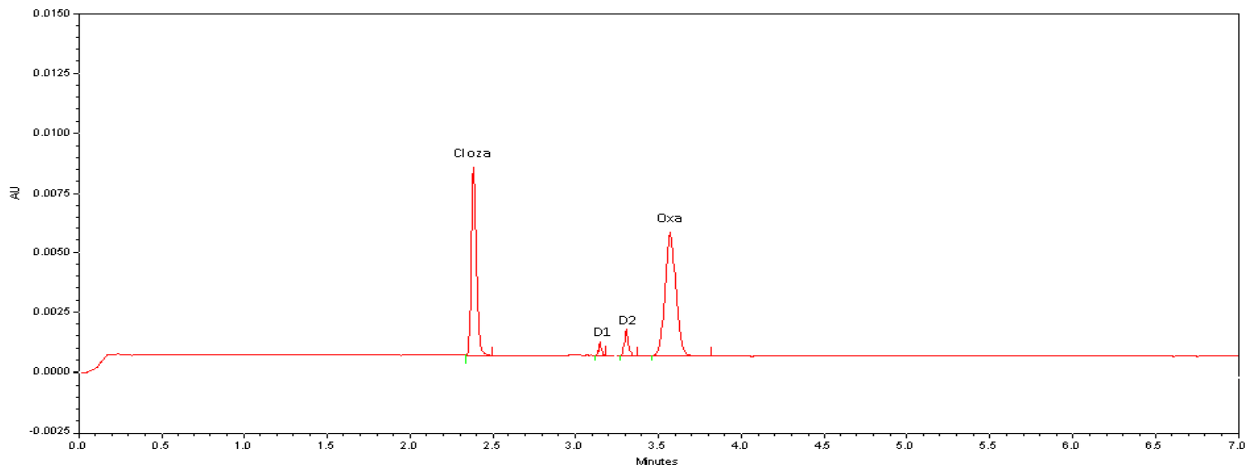


Figura 59. Eletroferograma obtido após estresse por fotólise da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , $\text{pH} = 2,5$ ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector $\times 50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s.

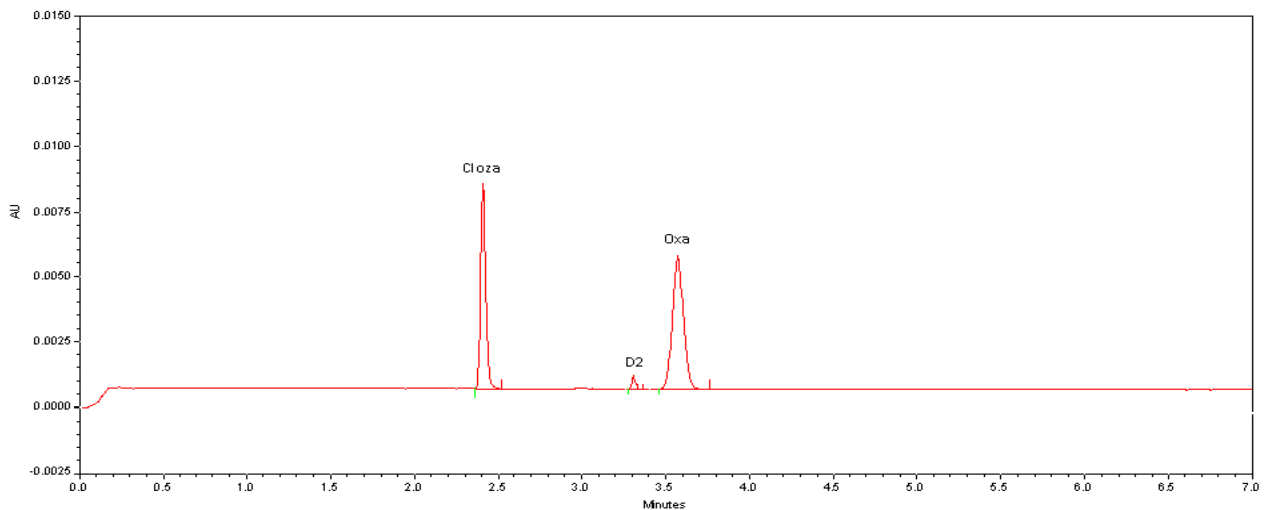


Figura 60. Eletroferograma obtido após estresse térmico da solução amostra comercial contendo oxamniquina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e clozapina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Condições: 60°C / 7 dias. Eletrólito: fosfato de sódio monobásico 30 mmol.L^{-1} , $\text{pH} = 2,5$ ajustado com ácido orto-fosfórico e adicionado 18% de metanol. Coluna capilar de sílica fundida de 20 cm até detector $\times 50 \mu\text{m}$ d.i., voltagem aplicada +25 kV, temperatura 20°C , Detecção UV em 254 nm e injeção hidrodinâmica por pressão 0,5psi/3s.

5.5.1. Linearidade

Para avaliação da linearidade da metodologia proposta pela técnica de CE, foram preparadas amostras nas concentrações de 80,0 a 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do ativo e da impureza conforme tabela 14, utilizando padrão de clozapina como padrão interno em concentração fixa.

Foram feitas injeções em 3 replicatas de cada nível para a composição da curva de calibração.

Os dados obtidos estão na **Tabela 22**.

Tabela 22 - Oxamniquina: valores de área obtidos - linearidade

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Razão das áreas dos picos (A/A)*	DPR (%)
Clozapina	Oxamniquina		
100	80	0,992	2,02
100	90	1,092	1,92
100	100	1,233	1,18
100	110	1,341	1,05
100	120	1,457	1,12

* Média de leituras

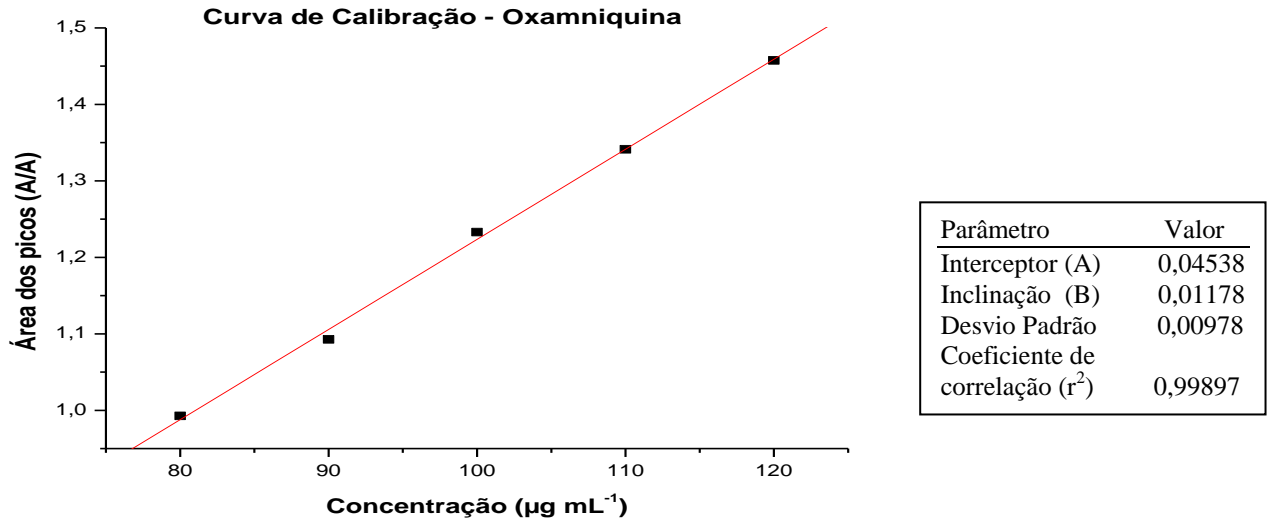


Figura 61. Curva analítica resultante da análise da solução padrão de Oxamniquina utilizando CE

Tabela 23 - Uk-3883: valores de área obtidos - linearidade

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Área do pico (A/A)	DPR (%)
Clozapina	Uk		
100	80	0,895	1,02
100	90	1,019	0,86
100	100	1,134	0,98
100	110	1,240	0,97
100	120	1,409	1,43

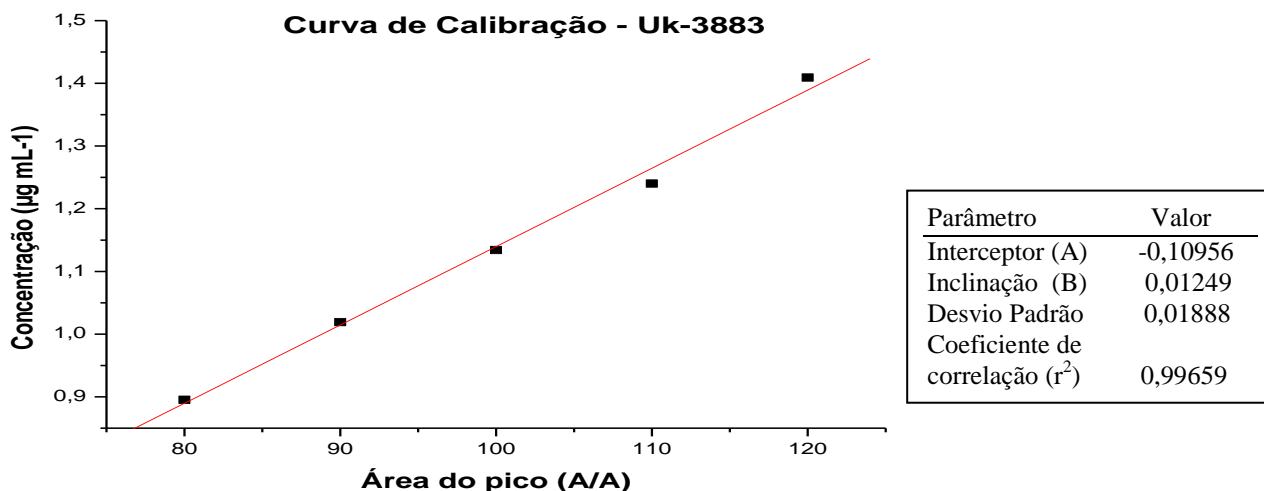


Figura 62. Curva analítica resultante da análise da solução padrão de Uk-3883 utilizando CE

Os resultados obtidos na linearidade nas faixas de concentração trabalhadas indicam coeficiente de correlação acima de 0,99 e apresentam uma relação linear de x e y nas curvas analíticas de oxamniquina e de uk-3883 (**Figura 61 e 62**, respectivamente), indicando uma pequena dispersão do conjunto de pontos experimentais, confirmada pela DPR < 2,0% entre as concentrações trabalhadas.

5.5.2. Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados através da curva analítica construída com os resultados obtidos no teste de linearidade e tem seus valores expressos na **Tabela 23**.

Tabela 24 - Resultados de LD e LQ de Oxamniquina e de Uk-3883

	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Oxamniquina	Uk-3883
LD	2,74	4,99
LQ	8,30	15,12

5.5.3. Precisão

A precisão foi calculada pelo desvio padrão relativo (DPR%) entre as razões de oxamniquina/clozapina e uk-3883/clozapina, utilizando 6 determinações na concentração do nominal do método proposto. De acordo com a RE 899 da ANVISA, não se admitem valores superiores a 5%.

Para ambos os analitos foram observadas variações (DPR%) menores que 2% dentre as replicas avaliadas o que indica que o método analítico é repetitivo (**Tabela 25**).

Tabela 25 - Resultados relativos às razões do ensaio de precisão - CE

Analito	Razão D1	Razão D2	Média	DPR (%)
Oxamniquina	1,261	1,245	1,2751	1,86
	1,277	1,274		
	1,274	1,257		
	1,305	1,251		
	1,302	1,247		
	1,309	1,299		
Uk-3883	1,163	1,147	1,1506	1,30
	1,136	1,171		
	1,153	1,142		
	1,136	1,124		
	1,167	1,146		
	1,135	1,186		

5.5.4. Precisão intermediária

A **Tabela 25** apresenta os resultados obtidos na determinação da precisão intermediária para a metodologia desenvolvida por CE. Observa-se que o desvio-padrão relativo (%DPR) das áreas dos picos foi menor que 2%, portanto a precisão de injeção foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação³⁸.

Tabela 26 – Resultados obtidos nas determinações de precisão intermediária - CE

	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão intermediária (%DPR)
Oxa	80,0	0,74
	100,0	0,43
	120,0	0,39
Uk	80,0	0,88
	100,0	0,61
	120,0	0,31

5.5.5. Exatidão

A exatidão do método pela técnica de CE foi determinada pelo teste de recuperação, em três níveis de concentração. A recuperação média encontrada para a oxamniquina foi de 99,01 % e para uk-3883 foi de 98,97 %, indicando assim boa correspondência entre as quantidade adicionadas ao placebo de solução padrão e as quantidades recuperadas. A **Tabela 27** mostra os resultados do teste de recuperação para os fármacos estudados.

Tabela 27 - Resultados obtidos na determinação da recuperação do método por CE

Analito	Quantidade de padrão adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Quantidade de padrão recuperado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação * (%)
Oxamniquina	80	79,85	99,8
	100	98,12	98,1
	120	118,92	99,1
Uk-3883	80	78,69	98,4
	100	99,22	99,2
	120	119,21	99,3

5.6 Comparação entre técnicas de CE e HPLC para a determinação e quantificação de oxamniquina e uk-3883

Os resultados obtidas na determinação da oxamniquina e da uk-3883 podem ser observados na **Tabela 28**.

Tabela 28 – Parametros estatísticos e estudo comparativo entre CE e HPLC para a determinação e quantificação de oxamniquina e uk-3883

Parâmetros	oxamniquina		Uk-3883	
	HPLC	CE	HPLC	CE
Média n=6	100,11	101,22	99,07	100,1
DPR (%)	0,61	1,54	0,82	1,3
Teste F^a	2,52		1,59	
Teste t^b	1,64		0,69	

^a Valor crítico de F 95% de significância P= 95% = 5,05

^b Valor crítico de t student com 95% de significância P = 95 = 2,571

Pela comparação estatística utilizado os testes F (Fisher - Snedecor) (F encontrado < F crítico) e t Student's (t encontrado < t crítico) demonstrou que não há diferenças significativas entre os dois métodos propostos.

6. CONCLUSÃO

A partir das condições experimentais conduzidas durante a realização deste trabalho e os resultados obtidos, pode-se concluir:

- ✓ Os métodos desenvolvidos para determinação quantitativa de oxamniquina em formulações farmacêuticas são simples, rápidos, exatos e precisos;
- ✓ A impureza uk-3883 apresentou comportamento parecido ao do ativo e os testes de adequação dos parâmetros de validação pelas técnicas de HPLC e CE teve resultados dentro dos parâmetros propostos pelas instituições competentes;
- ✓ Para a técnica de CE, a clozapina, utilizada como padrão interno, apresentou-se como adequada, pois respondeu bem as condições trabalhadas para a oxamniquina e uk-3883, sem interferir em sua migração e indispensável devido a flutuação presente no volume das injeções das amostras no equipamento para a aquisição dos dados;
- ✓ Os métodos desenvolvidos demonstraram ser adequados pra a determinação de oxamniquina em amostras comerciais e para oxamniquina e uk-3883 em soluções associadas demonstrando seletividade, linearidade, precisão e exatidão aceitáveis conforme legislação nacional e internacional;
- ✓ Para o doseamento do ativo no Mansil (amostra comercial) foram obtidos valores de teor dentro das especificações. Estes resultados indicam que o medicamento esta sendo fabricado de acordo com as boas praticas de fabricação e qualidade;
- ✓ Estatisticamente não há diferenças significativas entre os dois métodos utilizados (HPLC e CE);

7. REFERÊNCIAS

- [1] UNITED STATES *Pharmacopeia*, 23st ed. Rockville: The United States Pharmacopeical Convention, 1995, pp. 1120-1122.
- [2] ALMEIDA, A. E. ; SOUZA, A. L. R.; ALLEGRETTI, S. M.; FREZZA, T. F.; PINTO, M. C.; FERREIRA A. G.; CHUNG, M. C. “Síntese e atividade biológica do derivado de 6-formil-oxamniquina,” **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 44, n. 4, pp. 740-754, 2008.
- [3] REY, L. **Bases da parasitologia médica**, 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 2008, pp. 153-169.
- [4] HANG, H. P. ; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**, 6ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- [5] KATZUNG, B. G. “Farmacologia clínica dos anti-helminticos,” **Farmacologia básica e clínica**, 9ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara e Koogan, 1998.
- [6] CARVALHO, E. M. F.;ACIOLI, M. D.; F. BRANCO, M. A.; COSTA, A. M.; CESSÉ, E. A. P.; ANDRADE A. G.; MELLO, E. M. L. L. “Evolução da esquistossomose na Zona da Mata Sul de Pernambuco. Epidemiologia e situação atual: controle ou descontrole?,” **Cad. Saúde Pública**, vol. 14, n. 4, pp. 787-795, 1998
- [7] FILHO, S. B.; GARGIONI, C.;PINTO, P. L. S.; CHIODELLI, S. G.;VELLOSA, S. A. G. SILVA, R. M.; SILVEIRA, M. A. B. “Synthesis and evaluation of new oxamniquine derivatives,” **International Journal of Pharmaceutics**, n. 233, pp. 53-41, 2002.
- [8] CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. “Drug resistance in schistosomes,” **Parasitol. Today**, vol. 9, n. 5, pp. 162-166, 1993.
- [9] Silva, K.E.R.; Alves, L.D.S.; Soares, M.F.R.; Passos, R.C.S.; Faria, A.R.; Rolim Neto, P.J. “Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica,” **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, vol. 30, n. 2, pp. 129-135, 2009.
- [10] BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, “Farmacopéia Brasileira”, em Cromatografia a líquido de alta eficiência, 5. ed., Brasília, 2010, p.109.
- [11] International Conference on Harmonization ICH Q1A (R2): Stability testing of new drug substances and products. Geneva. Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 11 junho 2014.

[12] Brasil. Informe técnico n.1 de 15 julho 2008. Agência Nacional de Vigilância Sanitária,. Disponível em: <
http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/informes/2008/01_160708.htm > Acesso em:
11 junho 2014.

[13] PRABUL, S.; SURIYAPRAKASH, T. "Impurities and its importance in pharmacy," **International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 3, n. 3, pp. 66-71, 2010.

[14] KOSJEK, T. ; ZIGON, D.; KRALJ, B.; HEATH, E. "The use of quadrupole-time-of-flight mass spectrometer for the elucidation of diclofenac biotransformation products in wastewater," **Journal of Chromatography A**, vol. 1215, pp. 57-63, 2008.

[15] LIU, M.; RONK, M.; REN, D.; OSTOVIC, J.; CAUCHON, N.; ZHOU, Z. S.; CHEETHAM, J. "Structure elucidation of highly polar basic degradants by on-line hydrogen/deuterium exchange hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry," **Journal of Chromatography A**, vol. 1217, pp. 3598-3611, 2010.

[16] STEINBECK, C.; KUHN, S. "NMRShiftDB – compound identification and structure elucidation support through a free community-built web database," **Phytochemistry**, vol. 65, pp. 2711-2717, 2004.

[17] TOPCU, G.; ULUBELEN, A. "Structure elucidation of organic compounds from natural sources using 1D and 2D NMR techniques," **Journal of Molecular Structure**, Vols. %1 de %2834-836, pp. 57-73, 2007.

[18] KESKIN, S. S.; ASLAN, N.; BAYRAKÇEKEN, F. "Structure elucidation of laser dye coumarin-540A by joint application of X-ray diffraction, X-ray fluorescence, prompt fluorescence, UV and visible spectroscopy," **Spectrochimia Acta Part A**, vol. 67, pp. 762-766, 2007.

[19] DE MARCO, R.; JIANG, Z.-T.; PEJCIC, B.; van RIESSEN, A. "In situ synchrotron radiation grazing incidence X-ray diffraction—A powerful technique for the characterization of solid-state ion-selective electrode surfaces," **Electrochimica Acta** , vol. 51, pp. 4886-4891, 2006.

[20] BHATTACHARYA, B.; CHATTOPADHYAY, B.; CHAKRABORTY, S.; ROY, B. N.; SINGH, G. P.; GODBOLE, H. M.; RANANAWARE, U. R.; MUKHERJEE, A. K. "Tris(hydroxymethyl) aminomethane salt of ramipril: Synthesis, structural characterization from X-ray powder diffraction and stability studies," **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 70, pp. 280-287, 2012.

[21] PIERRI, E.; ALMEIDA, A.; GREMIA, M. "Determination of oxamniquine in capsules by HPLC.," **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 26, pp. 675-679, 2001.

[22] FELL, A. F.; NOCTOR, T. A. G.; KAYE, B. "In vitro metabolism studies on oxamniquine and related compounds by chiral liquid chromatography," **Journal of Pharmaceutica e Biomedical Analysis**, vol. 7, n. 12, pp. 1743-1748, 1989.

[23] ABUSHOFFA, A. M.; CLARK, B. J. "Resolution of the enantiomers of oxamniquine by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography with cyclodextrins and heparin as chiral selectors," **Journal of Chromatography A**, vol. 700, pp. 51-58, 1995.

[24] NEVES, D.; MELO, A.; LINARDI, P.; VITOR, R. **Parasitologia Humana**, 11 ed., São Paulo: Atheneu, 2005.

[25] MARKELL, E.; JOHN, D.; KROTOSKI, W. "Parasitologia Médica," **Os trematódeos**, 8. ed., Rio de Janeiro, Guanabara e Koogan, 2003, p. 207.

[26] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**, 6. ed., Porto Alegre: Bookman, 2009, p. 836.

[27] Galdos, A. A. G. Desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade para medicamentos que atuam no diabetes millitus tipo II. Tese (Doutorados em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012, p.174

[28] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, "Farmacopéia Brasileira," *Cromatografia a Líquido de alta eficiência*, 5. ed., Brasília, 2010, p. 109.

[29] United States Pharmacopea, 23st ed. United States Pharmacopeical Conention, Rockville, 1995, p.1120-1122.

[30] Collins, C.; Braga, L.; Bonato, O. **Fundamentos de Cromatografia**, Campinas: Unicamp, 2009, pp. 275-276.

[31] NICÉSIO, R. "Métodos cromatográficos," *Biomedicina Brasil*, Disponível em: <http://www.biomedicinabrasil.com/2012/10/metodos-cromatograficos.html>. Acesso em: 20 junho 2013.

[32] MORAES, M.; LAGO, C. " Espectroscopia de massas com ionização por "ELECTROSPRAY" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas," **Química Nova**, vol. 26, n. 4, pp. 556-563, 2003.

[33] COLOMBARA, R.; TAVARES, M.; MASSARO, T. "Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações," **Química Nova**, vol. 20, n. 5, pp. 512-518, 1997.

[34] LIEN, E.; REN, S.; BOYLAN, J. "Calorimetry in Pharmaceutical Research and Development," **Encyclopedia of pharmaceutical technology**, 2. ed., vol. 2, New York, Basel: Marcel Dekker, 2002, p. 290.

- [35] MORAES, M.; MORAES, S.; PEREIRA, E.; TAVARES, M. "Estratégias de Pré-Concentração em Eletroforese Capilar (CE). Parte 1. Manipulação da Velocidade Eletroforética do Analito," **Química Nova**, vol. 32, n. 4, pp. 1041-1046, 2009.
- [36] GIL, E. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**, 3. ed., São Paulo: Pharmabooks, 2010, pp. 50-51.
- [37] TAVARES, M. "Eletroforese capilar: conceitos básicos," **Química Nova**, vol. 19, n. 2, pp. 173-181, 1996.
- [38] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, "Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 A Secretaria de Vigilância Sanitária determina a publicação do "Guia par validação de métodos analíticos e bioanalíticos"," 29 maio 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 13 junho 2013.
- [39] United States Pharmacopeia online, 34st ed., "<1225> Validation of Compendial Procedures," Acesso em: 30 abril 2012.
- [40] BAKER, D. R. **Capillary Electropforesis**, New York: Jonh Wiley, 1995, p. 244.
- [41] QUEIROZ, S. C. N.; JARDIM, I. C. S. F. "Eletroforese capilar," Chemkeys, p. 9, 2001.
- [42] QUEIROZ S. N.; JARDIM, I. C. S. F. "Chemkeys," 2001. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/article1.php?u=ZWxldHJvZm9yZXNILWNhcGlsYXI=>>. Acesso em: 18 junho 2013.
- [43] ALTRIA, K. D. **Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation and applications**, Totowa: Humana Press, 1996, p. 349.
- [44] QUEIROZ, S. N.; JARDIM, I. C. S. F. "Chemkeys," Disponível em: <http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/article1.php?u=ZWxldHJvZm9yZXNILWNhcGlsYXI=>. Acesso em: 18 junho 2013.
- [45] ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. "Capillary electrophoresis and electrochromatography," **Chemical Analysis - Modern Instrumentation Methods and Techniques**, 2 ed., Chichester, Jonh Wiley, 2007, pp. 145-161.
- [46] SILVA, J. A. F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. "Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares," **Quim. Nova**, vol. 30, n. 3, pp. 740-744, 2007.
- [47] ORLANDINI, S.; GOTTI, R.; FURLANETTO, S. "Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review," **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2013.

- [48] FELL, A. F.; NOCTOR, T. A. G.; MAMA, J. E.; CLARK, B. J. "Computer-aided optimisation of drug enantiomer separation in chiral high-performance liquid chromatography," **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, vol. 434, n. 2, pp. 377-384, 1988.
- [49] NOCTOR, T. A. G.; FELLI, A. F. "High-Performance liquid chromatographic resolution of oxamniquine enantiomers: Application to in vitro metabolism studies," **Chirality**, vol. 2, n. 4, pp. 269-274, 1990.
- [50] JUN, H. W.; RADWAN, M. A. "High performance liquid chromatographic determination of oxamniquina in plasma samples," **Anal. Lett.**, vol. 18, n. 11, pp. 1345-1355, 1985.
- [51] ALMEIDA, A. E.; FERREIRA, A. G.; CRESPI, M.S.; ANDRADE, Z. A.; CHUNG, M.-C. "Spectrophotometric determination of some pharmaceutically important nitro compounds in their dosage forms," **Analyst**, vol. 113, pp. 1087-1089, 1988.
- [52] KELANI, K.; BEBAWY, L. I.; ABDEL-FATTAR, L.; AHMAD, A. K. S. "Spectrophotometric determination of some n-donating drugs using DDQ," **Anal. Lett.**, vol. 30, n. 10, pp. 1843-1860, 1997.
- [53] EL-ENANY, N.; AHMIDA, N.; BELA, F. "Spectrofluorimetric and spectrophotometric determination of oxamniquine in pharmaceuticals and biological fluids via derivatization with 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl)," **Journal of the Chinese chemical Society**, vol. 56, n. 3, pp. 485-492, 2009.
- [54] WOOLHOUSE, N. M.; WOOD, P. R. "Determination of oxamniquine in serum," **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 66, n. 3, pp. 429-430, 1977.
- [55] RIZK, M.; BELAL, F.; IBRAHIM, F.; AHMED, S. M.; EL-ENANY, N. M. "Fluorimetric determination of oxamniquine in biological fluids," **IL Farmaco**, vol. 54, pp. 47-50, 1999.
- [56] BULAS. Plataforma HiDoctor . Disponível em: <http://www.bulas.med.br/bula/3032/mansil.htm>. Acesso em: 2013 junho 12.
- [57] *European Pharmacopoeia*. 5.ed. Strassbourg: Council of Europe, 2004. P.2409-2411.
- [58] SWARTZ, Michael; KRULL, Ira. Developing and validating stability-indicating methods. **LC GC North America**, v.23, n.6, p.586-593, 2005
- [59] GUIDANCE, 2010 – GUIDANCE for industry, analytical procedures and method validation, U.S. Department of health and human services FDA, August 2000. Disponível em: HYPERLINK "http://www.fda.gov/guidance/index.htm". Acesso em :02 mar.2011
- [60] REYNOLDS, Dan W. et al. Conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical technology**, p. 48-56, 2002.

- [61] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, "Resolução RDC nº 53 de 20 de dezembro de 2013". Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 11 maio 2015.
- [62] FARIA, E.A; LELES, M.I.G.; IONASHIRO, M. ZUPPA, T.O. Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais. **Eclet Quím.** 2002; 27:111-9.
- [63] RODANTE, F.; VECCHIO, S.; CATALANI, G.; TOMASSETTI, M. Compatibility between active components of a commercial drug. **Farmaco** 2002; 26(2): 48-56
- [64] BAZZO, G.C.; SILVA, M.A.S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo Captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Bras Cienc Farm.** 2005; 41(3):315-22.
- [65] ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN-Jr, L.V.; **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos.** 8ª ed. Porto Alegre: Artemed; 2007. p.775.
- [66] SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. **Pharm Technol.**2000; 24:1-14.
- [67] FLORECE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia.** 3ª ed. São Paulo: Edusp; 2003. p. 711.
- [68] MORIWAKI, C.; BRESCANSIN, E.G.; HIOKA, N.; MAIONCHI, F.; MATIOLI, G. Estudo de degradação de fármaco Nabumetona por fotólise direta. **Acta Sci.** 2001; 23(3): 651-4.
- [69] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. 2004; **Química nova**, v.27, 771-80.
- [70] ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of chromatography B**, 2009; v.877, p.2224-34.

8. ANEXOS



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 8185940/1 - Elenice Luduvina da Silva Santos

Email: nicelud@usp.br
Data de Nascimento: 20/03/1983
Cédula de Identidade: RG - 44.536.097-5 - SP
Local de Nascimento:
Nacionalidade:
Graduação: Bacharel em Farmácia - Universidade Metodista de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2009

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 10/07/2012
Início da Contagem de Prazo: 10/07/2012
Data Limite para o Depósito: 06/11/2015
Orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Segunda Aurora Prado - 10/07/2012 até o presente.
 Email: msaprad06@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 10/07/2012
Licença(s) Maternidade: 180 dias
 Período de 17/09/2014 até 15/03/2015
Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 09/07/2015 até 06/11/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 26/09/2013
Data do Depósito do Trabalho: 06/11/2015
Título do Trabalho: "Desenvolvimento"
Data Máxima para Aprovação da Banca: 05/01/2016
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 10/07/2012
 Licença Maternidade em 17/09/2014
 Prorrogação em 22/05/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 8185940/1 - Elenice Luduvina da Silva Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
FBF5784-1/4	Eletroforese Capilar: Princípios e Aplicações na Área Farmacêutica	01/08/2012	02/10/2012	90	0	-	-	N	Turma cancelada
QFL5709-4/2	Amostragem e Preparação de Amostra (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	13/08/2012	15/10/2012	90	0	100	R	N	Concluída
FBF5777-2/7	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	16/08/2012	28/11/2012	45	3	93	B	N	Concluída
FBF5706-7/1	Preparação e Emprego de Padrões Farmacêuticos	15/10/2012	10/12/2012	60	4	83	B	N	Concluída
FBF5784-2/1	Eletroforese Capilar: Princípios e Aplicações na Área Farmacêutica	17/10/2012	18/12/2012	90	6	89	A	N	Concluída
FBC5817-1/4	A Prática da Cromatografia Líquida e Eletroforese Capilar	18/02/2013	28/04/2013	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5704-6/1	Análise Espectrométrica de Fármacos	04/03/2013	16/06/2013	150	10	90	A	N	Concluída
FBF5805-1/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	14/08/2013	17/09/2013	45	3	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	34
Estágios:			
Total:	0	25	34

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015

Impresso em: 09/11/2015 08:02:35

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 8185940/1 - Elenice Luduvina da Silva Santos

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
1590540	María Segunda Aurora Prado	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP