

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA O
CONTROLE DE QUALIDADE DE ANTI-RETROVIRAIS EM
MEDICAMENTOS UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR**

Luiz Antonio Zanolli Filho

Dissertação de Mestrado

Prof^a Dr^a Marina Franco Maggi Tavares

SÃO PAULO

13 de Junho de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUIZ ANTONIO ZANOLLI FILHO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA O
CONTROLE DE QUALIDADE DE ANTI-RETROVIRAIS EM
MEDICAMENTOS UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para a obtenção
do Título de Mestre em Química (Química
Analítica).*

Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo

2007

Luiz Antonio Zanolli Filho

Desenvolvimento de metodologias alternativas para o controle de
qualidade de anti-retrovirais em medicamentos utilizando eletroforese
capilar

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para a obtenção
do Título de Mestre em Química (Química
Analítica).*

Aprovado em: ____ / ____ / _____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Ao meu pai Luiz Antonio Zanolli, por tudo que ele fez por mim, pelo seu companheirismo, pela sua motivação e pela experiência de vida.

A minha mãe Maria do Carmo Zanolli, por sempre acolher nos momentos difíceis, e principalmente por ter ajudado a ser a pessoa que sou.

A minhas irmãs Elizabete Zanolli (Você que me ajudou a ser o químico que sou!) e Solange Zanolli Tahin (Você me acolheu!), por me aturarem nos momentos mais difíceis da minha vida, sempre me fazendo ter garra para vencer os obstáculos.

À minha orientadora Dra. Marina Franco Maggi Tavares, por ter me conduzido durante este projeto, pelo seu conhecimento, amizade e apoio.

Ao Fernando Gustavo Tonin (Tocando em frente sempre !!!), pela amizade, e pelas inúmeras reflexões as quais fizemos juntos, deste e de outros projetos.

Aos amigos das antigas Alexandre (Japa), João (Jão), Pedro, Giovana (Gica), Thiago e Vitor pelas horas de descontração e ajuda em diversos momentos.

Aos amigos Eduardo (LOKO), Eduardo (Lamas) e Bruno (Botaro), o 4 EA ainda existe !!!!!!!!!!!

Aos meus amigos de laboratório: Gustavo (pela iniciação!), José Luiz, Érica, Ana Carolina, Valéria, Edgar e Claudinei, pela amizade, pelas críticas e por terem ajudado direta ou indiretamente neste trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo.

∴

SUMÁRIO

CÁPITULO 1 – AIDS: uma visão global

1.1 – Introdução.....	2
1.2 – Ciclo replicativo do vírus HIV	4
1.3 – Referências.....	11

CAPÍTULO 2 – Eletroforese Capilar

2.1 – Introdução.....	14
2.1.1 – Equipamento de eletroforese capilar	15
2.1.2 – Fluxo eletrosmótico.....	16
2.1.3 – Equações fundamentais em eletroforese capilar	18
2.1.4 – Modos de separação em eletroforese capilar	20
2.2 – Eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (CE-MS).....	24
2.2.1 – Formação de íons.....	25
2.2.2 – Acoplamento CE-MS	26
2.3 – Análise de antiretrovirais por eletroforese capilar	28
2.4 – Referências.....	30

CAPÍTULO 3

3.1 – Objetivos.....	35
----------------------	----

CAPÍTULO 4 – Metodologia para determinação de nevirapina em formulações farmacêuticas

4.1 – Introdução.....	37
4.2 – Instrumentação	38
4.3 – Reagentes e solução	39
4.4 – Preparo amostras	40
4.5 – Desenvolvimento da metodologia.....	41
4.6 – Validação do método desenvolvido	44
4.6.1 – Linearidade, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	44
4.6.2. – Precisão do método – intra-ensaio	46
4.6.3 – Testes de recuperação	46
4.6.4 – Aplicação do método em amostras.....	47
4.6.5 – Robustez.....	48

4.7 – Conclusão.....	49
4.8 – Validação do método desenvolvido	50

CAPÍTULO 5 – Metodologia para determinação lamivudina em formulações farmacêuticas

5.1 – Introdução.....	52
5.2 – Instrumentação	53
5.3 – Reagentes e soluções	54
5.4 – Preparo das amostras.	55
5.5 – Desenvolvimento da metodologia.....	56
5.6 – Validação do método desenvolvido	59
5.5.1 – Linearidade, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	59
5.5.2. – Precisão do método – repetibilidade.....	61
5.5.3 – Testes de recuperação	62
5.5.4 – Aplicação do método em amostras.....	62
5.7 – Investigação de impurezas enantioméricas através da utilização de ciclodextrinas.....	64
5.8 – Conclusões.....	67
5.8 – Conclusões.....	68

CAPÍTULO 6 – Metodologia para determinação de estavudina, ritonavir e efavirenz em formulações farmacêuticas

6.1 – Introdução.....	70
6.2 – Instrumentação	71
6.3 – Reagentes e soluções	72
6.4 – Amostras.....	73
6.5 – Desenvolvimento da metodologia.....	74
6.6 – Validação do método desenvolvido para estavudina.....	83
6.6.1 – Linearidade, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	83
6.6.2 – Precisão do método.....	85
6.6.3 – Testes de recuperação	85
6.6.4 – Aplicação do método em amostras.....	86
6.7 – Validação do método desenvolvido para efavirenz.....	88
6.7.1 – Linearidade, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	88

6.7.2 – Precisão do método.....	89
6.7.3 – Testes de recuperação	90
6.7.4 – Aplicação do método em amostras.....	91
6.8 – Conclusões.....	92
6.7 – Referências.....	93

CAPÍTULO 7 – Metodologia para determinação de lamivudina, nevirapina, indinavir e zalcitabina em amostras de urina.

7.1 – Introdução.....	94
7.2 – Instrumentação	95
7.3 – Reagentes e soluções	95
7.4 – Amostras.....	96
7.5 – Desenvolvimento da metodologia.....	96
7.6 – Figuras de mérito da metodologia	98
7.7 – Conclusões.....	99
7.8 – Referências.....	99

CAPÍTULO 8 – Considerações finais

8.1 – Conclusões finais.....	101
8.2 – Perspectivas futuras	102

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	acetonitrila
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
AOAC	Association of Analytical Communities
CE	eletroforese capilar
CEC	eletrocromatografia capilar
CGE	eletroforese capilar em gel
CITP	isotacoforese capilar
CV	coeficiente de variação
CZE	eletroforese capilar em solução livre
D	média coeficientes de difusão
DM- β -CD	dimetil – β - ciclodextrina
DP	desvio padrão
EOF	fluxo eletrosmótico
ESI	ionização por electrospray
FDA	Food and drug administration
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	International Conference on Harmonisation
k	fator de retenção
L_{ef}	comprimento efetivo do capilar
LOD	limite de deteção
LOQ	limite de quantificação

L_{tot}	comprimento total do capilar
MEKC	cromatografia eletrocinética micelar
MeOH	metanol
MS	espectrometria de massas
M- β -CD	metil – β - ciclodextrina
OH- β -CD	hidróxi – β - ciclodextrina
PI	padrão interno
r	coeficiente de correlação
S	coeficiente angular
s	erro da regressão
SDS	dodecilsulfato de sódio
TBS	tetraborato de sódio
TEA	triethylamina
TRIS	tris-hidroximetilaminometano
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
V	Voltagem
μ	mobilidade eletroforética
μ_{eo}	mobilidade eletrosmótica
μ_{ep}	mobilidade eletroforética
$\mu_{média}$	mobilidade média

RESUMO

Zanolli Filho, L. A. Desenvolvimento de metodologias alternativas para o controle de qualidade de antiretrovirais por eletroforese capilar. 2007.102p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Atualmente cerca de 38,6 milhões de pessoas estão infectadas pelo vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em todo mundo. O único modo de tratamento para esta doença é através da utilização de medicamentos responsáveis por atuarem em diferentes pontos do ciclo replicativo do vírus. No Brasil esta doença é tratada como de calamidade pública, sendo seu tratamento feito através do programa nacional DST/AIDS, o qual distribui gratuitamente os medicamentos necessários para o tratamento. Tendo em vista que vários desses medicamentos são formulados pela indústria local, esta dissertação tem como objetivo o desenvolvimento de métodos analíticos passíveis de aplicação na rotina farmacêutica para a qualificação de matérias primas, bem como o controle de qualidade dos produtos acabados. As determinações nas formulações de nevirapina e lamivudina foram realizadas por CZE, em eletrólitos ácidos com $\text{pH} < 2,5$. Para a lamivudina a determinação foi realizada em um eletrólito de 0,5 % de TEA, 20 mmol.L^{-1} de TRIS, $\text{pH} = 2,5$, ajustado com ácido fosfórico, com um tempo de análise inferior a 4 minutos. O método desenvolvido para a nevirapina foi conduzido em um eletrólito de 10 mmol.L^{-1} de fosfato de sódio ($\text{pH} = 2,5$), com um tempo de análise de 3 minutos. Um outro método foi desenvolvido permitindo a determinação de efavirenz, estavudina e ritonavir por MEKC, utilizando-se um planejamento fatorial 2^3 com ponto central, um tempo inferior a 9 minutos em um eletrólito constituído de 20 mmol.L^{-1} de tetraborato de sódio, 20 mmol.L^{-1} de SDS e 30 % de acetonitrila. Os métodos desenvolvidos foram validados de acordo com os protocolos oficiais, mostrando que estes métodos apresentam características adequadas para a análise de formulações farmacêuticas. Outra abordagem foi feita utilizando o acoplamento da eletroforese capilar à espectrometria de massas, onde amostras de urina fortificadas foram analisadas. As análises foram conduzidas utilizando 400 mmol.L^{-1} de ácido fórmico e líquido auxiliar constituído de 0,5 % de ácido fórmico diluído com uma solução metanol:água (1:1), permitindo a identificação inequívoca dos fármacos.

Palavras-chave: eletroforese capilar, antiretrovirais, cromatografia eletrocínica micelar, eletroforese capilar em solução livre, espectrometria de massas,

ABSTRACT

Zanolli Filho, L. A. Desenvolvimento de metodologias alternativas para o controle de qualidade de antiretrovirais por eletroforese capilar. 2007. 102p. Masters Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

There are approximately 38.6 million people infected by the immunodeficiency acquired virus (AIDS) over the world. The only way of treatment for this illness is administrating drugs that act in different points of the replicative cycle of the virus. In Brazil this illness is dealt as public calamity, being its treatment made through the national program DST/AIDS, which distributes free of charge necessary medicines for the treatment. Considering that many of these drugs are formulated by the local industries, this thesis has as objective the development of analytical methods to be applied in the pharmaceutical routine for the qualification of raw materials, as well as the quality control of the finished products. The analysis of drug formulations of nevirapine and lamivudine were carried by CZE, in acid electrolytes with $\text{pH} < 2.5$. For lamivudine the analysis was carried using an electrolyte composed of 0.5 % of TEA, 20 mmol.L^{-1} of TRIS, $\text{pH} = 2.5$, adjusted with phosphoric acid, with an analysis time less than 4 minutes. The method developed for the nevirapine, was lead in an electrolyte composed of 10 mmol.L^{-1} of phosphate buffer ($\text{pH} = 2.5$), with a time of analysis of 3 minutes. Another method was developed for efavirenz, estavudine and ritonavir by MEKC, using 2^3 a factorial design with central point, with an analysis time less then 9 minutes in an electrolyte of 20 mmol.L^{-1} of sodium tetraborate, 20 mmol.L^{-1} sodium dodecyl sulfates and 30 % acetonitrile. The developed methods were validated in accordance with official protocols, showing that these methods can be advantageously used in the analysis of pharmaceutical formulations. Another approach was to use the coupling of capillary electrophoresis with mass spectrometry, where fortified samples of urine had been analyzed. The analysis were performed using 400 mmol.L^{-1} formic acid and liquid sheath consisting of 0.5 % of formic acid diluted with a solution of (1:1) methanol:water, allowing the unequivocal identification detection of the drugs in the samples.

Keywords: capillary electrophoresis, antiretrovirals, micellar electrokinetic chromatography, free solution capillary electrophoresis, mass spectrometry.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1.1 – AIDS: Uma visão global

Desde o surgimento dos primeiros casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) em meados de 1981, a doença tem se espalhado por diversas regiões do globo, sendo considerada uma das doenças infecciosas mais terríveis da história¹.

Atualmente, segundo relatório anual da AIDS Epidemic Update de 2006, estima-se que 38,6 milhões de pessoas estejam infectadas pelo vírus (Figura 1.1). No mesmo ano cerca de 3,1 milhões de pessoas morreram devido a AIDS. Infelizmente, estima-se que a epidemia de AIDS ainda continua a crescer em diversas regiões do planeta, principalmente na África sub-Saariana. Em países e regiões como a China, Índia e partes da Europa Oriental e da Ásia Central, estes números vem crescendo anualmente².

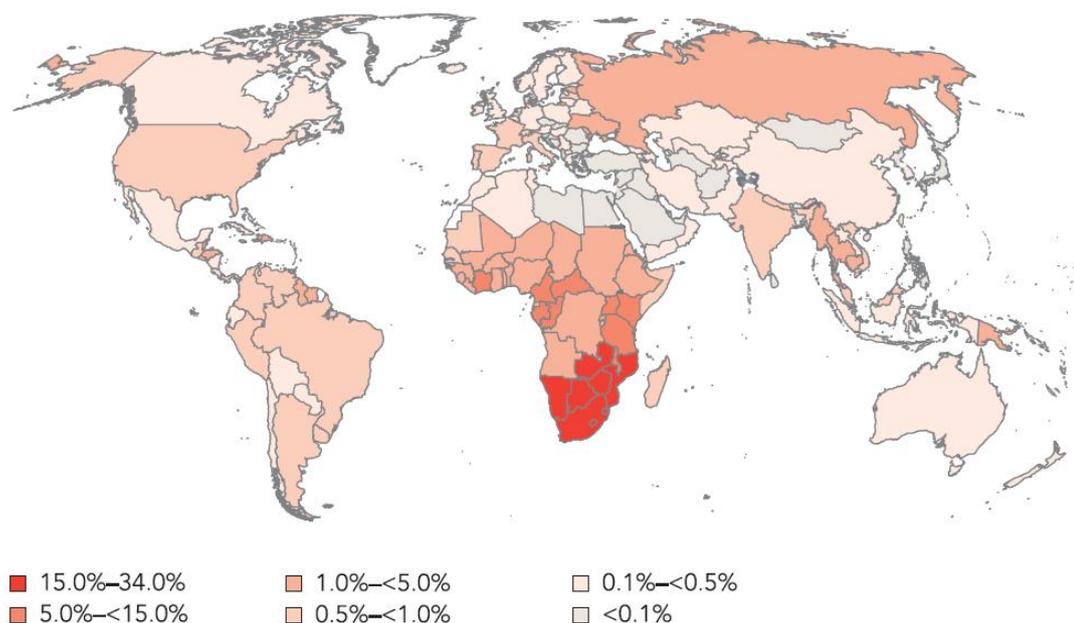


Figura 1.1 – Porcentagem estimada de adultos e crianças vivendo com AIDS no final de 2006².

No Brasil, de 1980 até dezembro de 2002, foram registrados 257.771 casos da doença, com 113.840 óbitos conhecidos. Através de inquéritos sorológicos realizados pelo Ministério da Saúde, estima-se a existência de 536.000 brasileiros infectados pelo vírus HIV (do inglês, Human immunodeficiency virus)^{3,4}.

Cabe ressaltar três grandes fases da evolução desta epidemia: 1 – fase inicial, caracterizada pela infecção entre homens que fazem sexo com outros homens, e por um nível de escolaridade alto dos pacientes; 2 – uma segunda fase, caracterizada pelo incremento de casos devido a transmissão por uso de drogas injetáveis, como a conseqüente diminuição do grupo etário e maior disseminação entre indivíduos heterossexuais; 3 – terceira e atual fase, quando se acentua a tendência de disseminação entre os heterossexuais, principalmente as mulheres⁵.

Esta última observação merece destaque, uma vez que tem sido relatada em vários países uma “feminização” da epidemia de AIDS. Em relação à distribuição de casos segundo a faixa etária, observou-se na última década um “envelhecimento” da mesma, com um aumento persistente de importância das faixas etárias acima de 35 anos, em ambos os sexos³.

Com relação a mortalidade, observa-se uma queda entre homens e mulheres, maiores de 13 anos, em meados da década de 90, principalmente entre 1996 e 1997, período que coincide com a garantia de acesso ao tratamento antiretroviral de alta eficiência (HAART, highly active antiretroviral therapy), conhecido como coquetel de drogas³.

1.2 – Ciclo replicativo do vírus HIV

A AIDS é uma doença pandêmica que possui como agente causador o vírus HIV, um retrovírus pertencente à subfamília *Lentivirinae*. Como todos os retrovírus, o genoma do HIV é codificado a partir do RNA que é transcrito a DNA pela enzima transcriptase reversa (RT). O principal alvo durante a infecção é o linfócito T CD⁴⁺. O vírus se liga ao linfócito por meio de uma glicoproteína (GP 120) e em seguida se funde à membrana celular graças à atuação de outra glicoproteína (GP 41), liberando seu material genético no citoplasma (Figura 1.2)⁶.

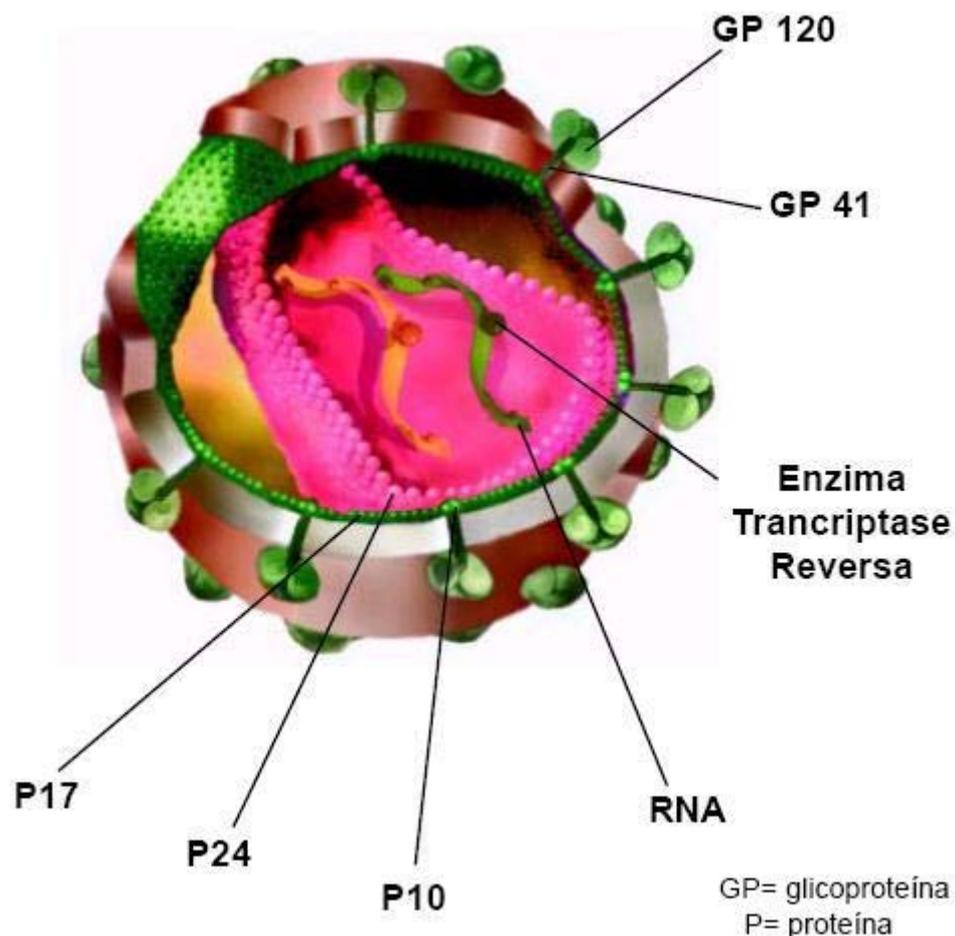


Figura 1.2 – Estrutura esquemática do vírus HIV-1⁷

Uma vez no interior do citoplasma a enzima transcriptase reversa é responsável pela replicação em uma fita dupla de DNA. A cópia de DNA é transportada para o núcleo celular onde uma enzima chamada *integrase* catalisa a incorporação do DNA viral (provírus) ao DNA hospedeiro. A expressão subsequente dos genes virais resulta na transcrição do RNA a partir do DNA do HIV-1 e na tradução das proteínas virais. As proteínas virais recém-formadas são, no entanto, produzidas na forma de precursores de poliproteínas, longas unidades compostas de enzimas virais e proteínas estruturais. As poliproteínas e o RNA viral movem-se para a superfície da célula onde ficam incorporados aos novos vírus que brotam na membrana celular, levando parte da mesma com eles para formar a camada externa viral. Os vírus recém-formados seriam, no entanto, não infectantes sem a ação de uma terceira e essencial enzima do HIV, a *protease*, a qual processa as poliproteínas virais em proteínas e enzimas estruturais funcionais (Figura 1.3)⁶.

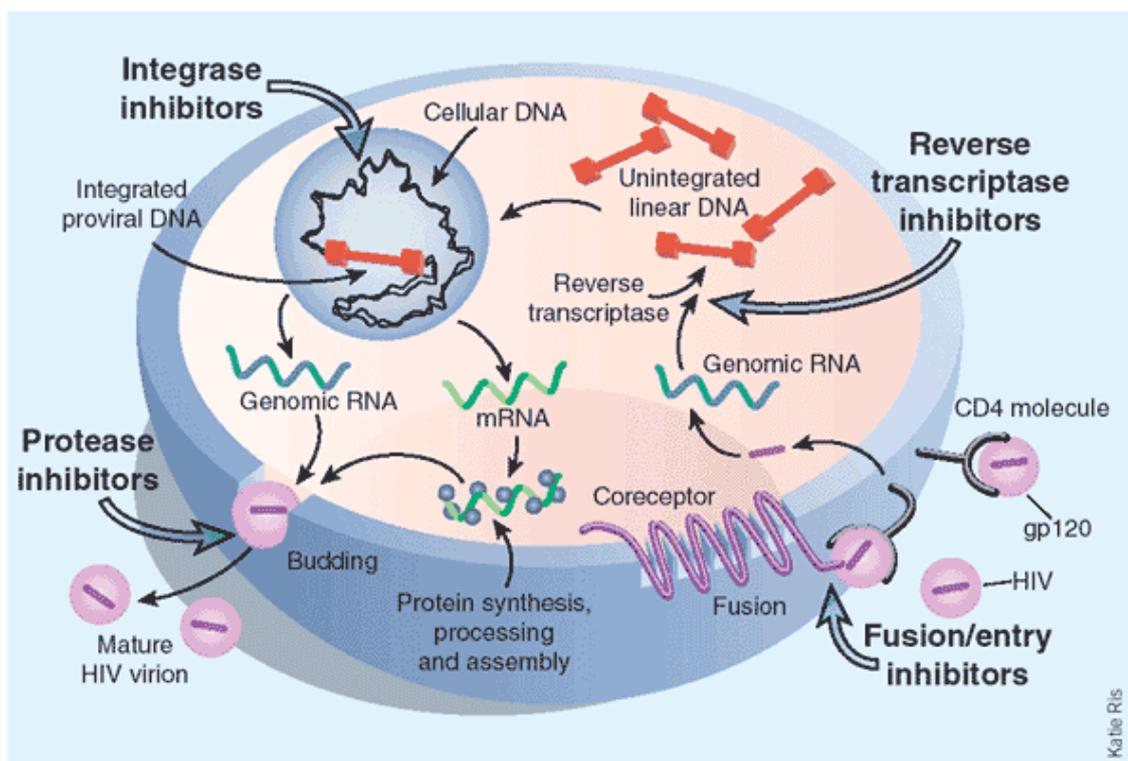


Figura 1.3 – Ciclo de vida do vírus HIV-1⁸.

Os medicamentos atualmente empregados no combate ao HIV aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), se baseiam na inibição das enzimas transcriptase reversa, protease e inibidores da fusão⁹. Também existem estudos em andamento buscando outros alvos no combate ao vírus tais como inibidores da enzima integrase e inibidores de entrada¹⁰.

No Brasil, a Lei 9113/96 garantiu a todos os indivíduos o acesso livre de custos ao coquetel de drogas¹¹. Introduzida em 1996, esta combinação de fármacos é capaz de inibir as etapas da replicação viral, podendo levar a uma diminuição de até 100 vezes a frequência de reprodução do vírus em comparação com as monoterapias utilizadas até então. Esta combinação de medicamentos é responsável por utilizar fármacos capazes de inibir diferentes etapas da replicação viral, sendo classificadas de acordo com as enzimas virais que inibem, dividindo-se em três categorias (Figuras 1.4, 1.5)^{12,13}.

Mesmo com o surgimento desta terapia, a qual diminui as partículas virais a níveis indetectáveis, o vírus persiste em reservatórios no organismo, como linfócitos T adormecidos. O surgimento e a velocidade de aparecimento de cepas resistentes a diferentes combinações de fármacos disponíveis no mercado também é um fator limitante^{1,10,14}.

Porém, um dos fatores que torna ainda mais difícil a terapia anti-HIV é a alta incidência de efeitos colaterais causados pelos fármacos atualmente disponíveis. Estudos mostram ser esta a principal causa de falhas na aderência à terapia antiretroviral (20,5 %), caracterizando-se principalmente por vômitos, diarreias, náuseas e dores abdominais, além de dores de cabeças e, até mesmo, alterações na coloração da pele^{15,16}.

Tudo isto fomenta uma grande necessidade de descoberta e/ou desenvolvimento de novos fármacos, bem como o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes para o controle de qualidade das matérias-primas, produtos acabados, e de métodos para o acompanhamento do tratamento, em amostras biológicas (sangue e urina).

1.3 – Referências

1. Fauci, A. S. HIV and AIDS: 20 years of science. Nature Medicine, v.9, n.7, Jul, p.839-843. 2003.
2. AIDS Epidemic Update 2006, <http://www.unaids.org>, acessada Abril 2007.
3. Coordenação Nacional de DST e AIDS, http://www.aids.gov.br/final/biblioteca/bol_dezembro_2002/boletim.asp, acessada Abril 2007.
4. Coordenação Nacional de DST e AIDS, http://www.aids.gov.br/final/biblioteca/bol_dezembro_2002/artigo2.asp, acessada Abril 2007.
5. National Institute of Allergy and Infectious Diseases – How HIV causes AIDS. www.niaid.nih.gov/factsheets/howhiv.htm, acessada Abril 2007.
6. Turner, B. G.; Summers, M. F. Journal of Molecular Biology, v.285, n.1, Jan 8, p.1-32. 1999.
7. <http://aidscongress.net/castanho1.gif>, acessada Maio 2007
8. Treatment – The replication cycle of HIV, <http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/AIDS/treatment.html>, acessada Maio 2007.
9. AIDSinfo, http://aidsinfo.nih.gov/other/cbrochure/english/05_en.pdf, acessada Abril 2007
10. Gulick, R. M. New antiretroviral drugs. Clinical Microbiology and Infection, v.9, n.3, Mar, p.186-193. 2003.
11. Coordenação Nacional de DST e AIDS, <http://www.aids.gov.br/final/biblioteca/drug/drug2.htm>, acessada Abril 2007.
12. Souza, M. V. N.; Almeida, M. V. Anti-VIH: Passado, Presente e Perspectivas Futuras. Química Nova, v.26, n.3, p.366-372. 2003.
13. Terapia inicial DST/HIV, <http://www.aids.gov.br>, acessada Maio 2007.
14. Melo, E. B.; Bruni, A. T.; Ferreira, M. M. C. Drogas. Inibidores da HIV-Integrase: potencial abordagem farmacológica para tratamento da AIDS. Química Nova, v.29, n.3, p.555-562. 2006.
15. Ligani Jr, L. L.; Grecco, D. B.; Carneiro, M. Avaliação da aderência aos anti-retrovirais em pacientes com infecção pelo HIV/Aids. Revista Saúde Pública, v.35, n.6, p.495-501. 2001.

16. Peçanha, E. P.; Antunes, O. A. C.; Tanuri, A. Estratégias Farmacológicas para a Terapia Anti-AIDS. Química Nova, v.25, n.6B, p1108-1116. 2002.

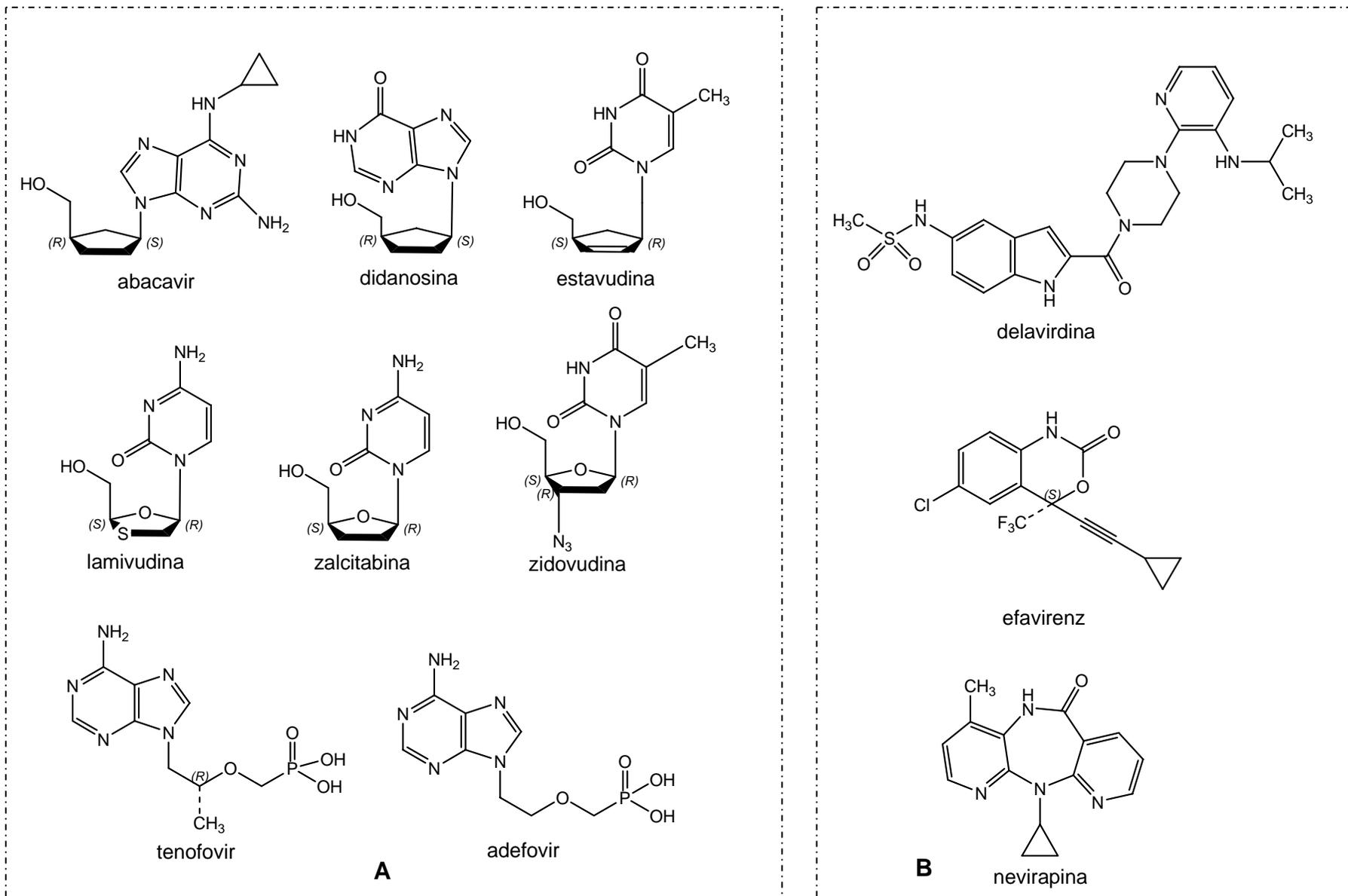


Figura 1.4 – Estruturas de inibidores (a) nucleosídicos e (b) não-nucleosídicos da enzima transcriptase reversa viral.

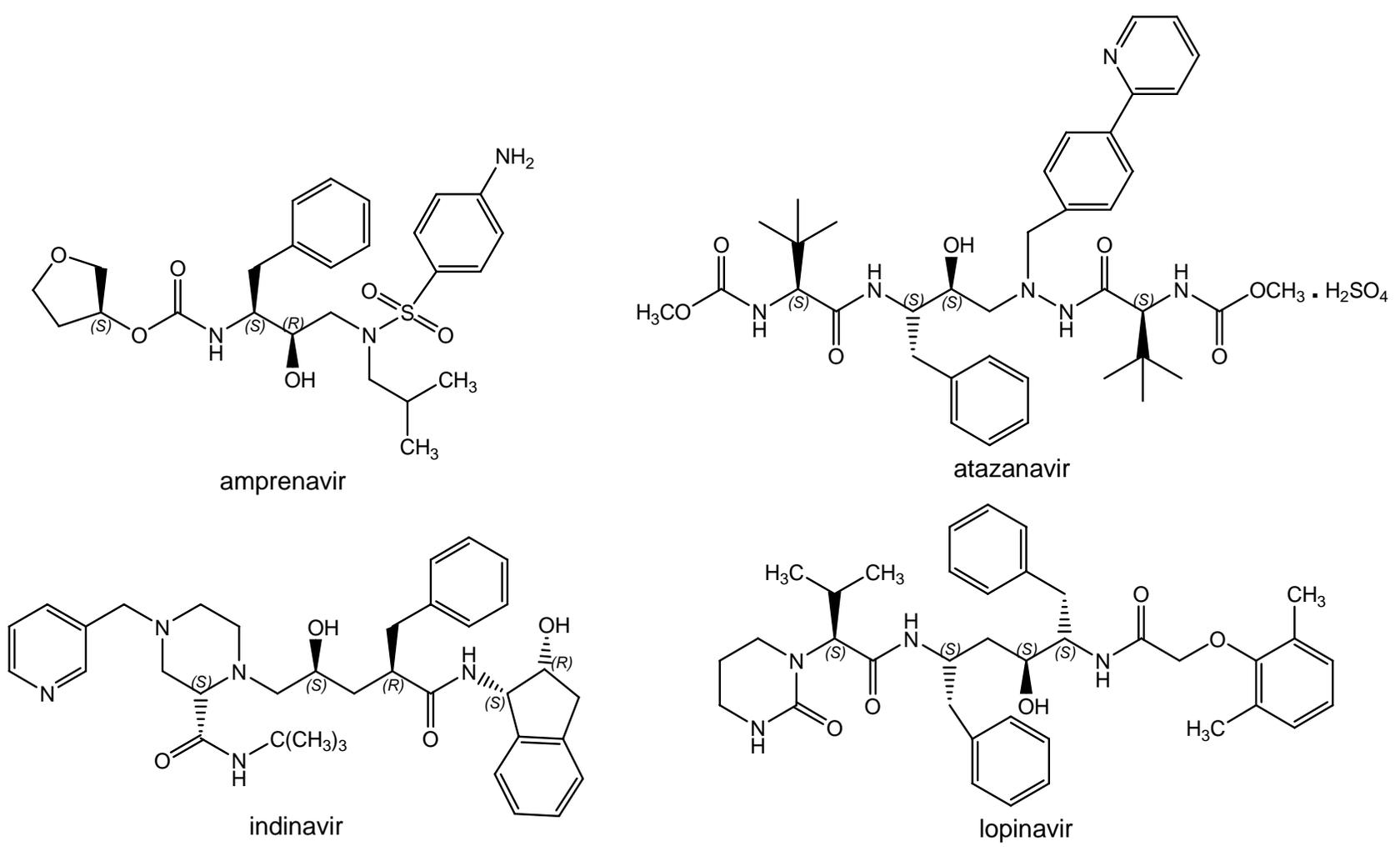


Figura 1.5 – Estruturas de inibidores da enzima protease viral.

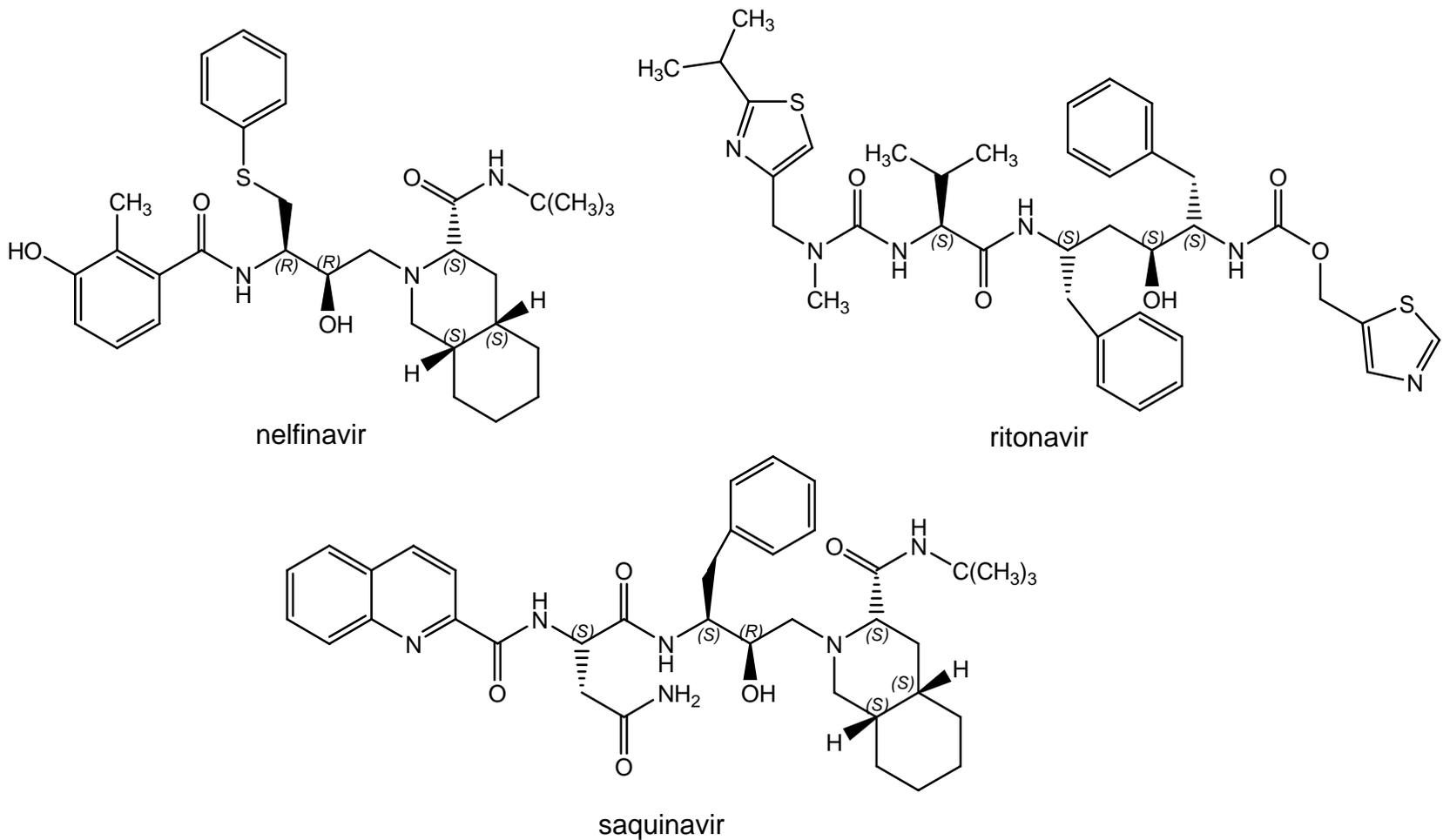


Figura 1.5 (continuação) – Estruturas de inibidores da enzima protease viral.

CAPÍTULO 2
ELETROFORESE CAPILAR

2.1 – Eletroforese Capilar (CE)

A eletroforese capilar é uma técnica de separação que se baseia na migração diferenciada de espécies iônicas ou ionizáveis, em um meio líquido, quando submetidas à ação de um campo elétrico¹.

A primeira análise realizada por eletroforese foi publicada em 1979 por Everaerts² e logo em seguida por Jogenson e Lukacs em 1981. Nos anos seguintes a eletroforese capilar passou a ser aplicada às mais diversificadas áreas: clínica, forense, alimentos, ambiental e farmacêutica³.

As separações em eletroforese capilar são conduzidas em tubos de dimensões capilares, preenchidos com eletrólito condutor, e submetidos a ação de um campo elétrico. A utilização de capilares de sílica fundida proporciona algumas vantagens frente a outros meios utilizados em eletroforese (placas de gel, papel). Devido à relação entre a área superficial interna e volume apreciavelmente grande, o capilar possibilita a dissipação mais eficiente do calor gerado pela passagem de corrente elétrica (efeito Joule). A alta resistência elétrica do capilar possibilita o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 500 V.cm⁻¹), o que resulta em separações de alta eficiência, muitas vezes excedendo 10⁵ pratos. Outras vantagens que podem ser citadas são: o volume de amostra necessário para análises é relativamente pequeno (1 a 10 nL, volume injetado), possibilidade de injeção e detecção em fluxo.

2.1.1 – Equipamento de eletroforese capilar

Um aspecto bastante importante da eletroforese capilar é a simplicidade da instrumentação. Na Figura 2.1 um equipamento de eletroforese capilar é representado esquematicamente, o qual consiste de uma fonte de alta tensão, capilares (normalmente de sílica fundida), eletrodos (geralmente de platina), um detector apropriado e um computador para o tratamento de dados.

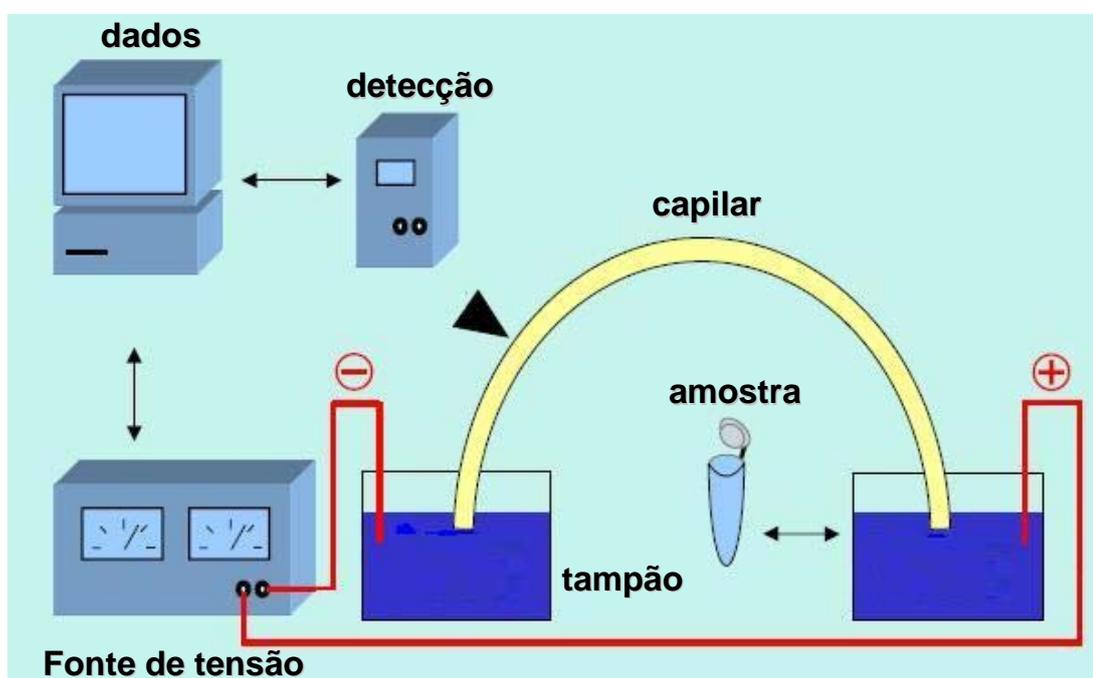


Figura 2.1 – Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar

A fonte de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar. As fontes, em geral, podem ser operadas à tensão constante ou corrente constante, com valores que variam de 0 – 30 kV e de 0 – 300 μ A, respectivamente. A injeção da amostra pode ser feita através de processos hidrodinâmicos ou eletrocinéticos. O capilar é mantido durante a separação a uma temperatura constante através da circulação de um líquido refrigerante ou por passagem de ar forçado. A aquisição dos dados é feita através de um sistema

interfaceado a um computador, responsável pela conversão do sinal analógico a digital.

2.1.2 – Fluxo eletrosmótico

A utilização de capilares de sílica fundida na execução da técnica introduziu uma importante peculiaridade: a geração do chamado fluxo eletrosmótico (Figura 2.2).

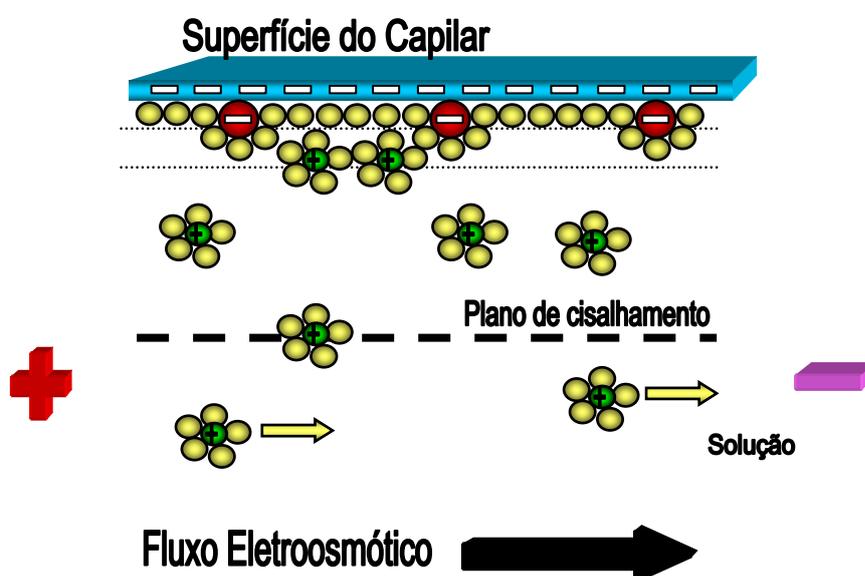


Figura 2.2 – Ocorrência do fluxo eletrosmótico.

O fluxo eletrosmótico é consequência de uma interação entre a solução e as paredes do capilar. Quimicamente, a sílica fundida é caracterizada pela presença de vários tipos de grupo silanol (SiOH), os quais apresentam caráter ácido. Em contato com uma solução, alguns desses grupos são ionizados e, com a ionização, a superfície do capilar torna-se negativamente carregada, gerando um saldo positivo de espécies carregadas positivamente no seio da solução. Quando um campo elétrico é imposto tangencialmente à superfície, forças elétricas causam um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a

migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo o fluxo da solução como um todo, na direção do cátodo, conhecido como fluxo eletrosmótico normal⁴.

Quando se torna necessário pode-se promover a inversão do fluxo, Figura 2.3. A forma mais amplamente empregada é a adição de tensoativos catiônicos ao eletrólito condutor, principalmente os derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa.

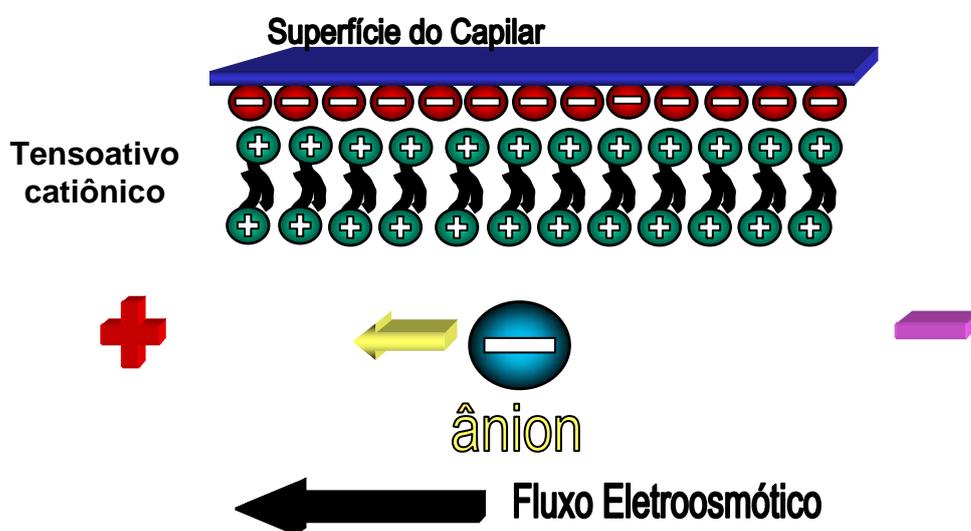


Figura 2.3 – Fluxo eletrosmótico invertido

Desta forma, uma camada de semi-micelas é adsorvida na superfície do capilar promovendo em solução, a organização de uma camada de ânions, que sob a ação do campo elétrico, migra na direção do ânodo, definindo o chamado fluxo eletrosmótico invertido.

2.1.3 – Equações fundamentais em eletroforese capilar⁵

As equações discutidas a seguir são aplicáveis à eletroforese capilar em solução livre praticadas em capilares de sílica fundida.

Quando uma espécie carregada eletricamente é exposta a um campo elétrico, essa migrará com velocidade (v_i) característica que é proporcional ao campo elétrico aplicado (E), como mostra a Equação 2.1.

$$v_i = (\mu_{ep} + \mu_{eo}) E \quad [2.1]$$

A constante de proporcionalidade engloba μ_{ep} , que é chamada de mobilidade eletroforética, onde f é o coeficiente de atrito, z é o número de cargas elementares do íon e e é a carga elementar. O coeficiente de atrito aumenta com o tamanho do íon e com a viscosidade do eletrólito e representa o quociente da carga q , e o coeficiente de atrito f .

$$\mu_{ep} = \frac{z \cdot e}{f} \quad [2.2]$$

Para soluções de eletrólitos compostos de um ácido ou base fracos, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio, a molécula não ionizada (com mobilidade zero), e a base ou ácido conjugado, cada qual com um valor particular de mobilidade. Assim, da mesma forma que os íons simples são caracterizados por um valor de mobilidade iônica, o conceito de mobilidade efetiva é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos. A mobilidade eletroforética efetiva (μ_{ef}) de um analito é dada pela somatória das mobilidades eletroforéticas (μ_j) de todas as n

espécies relacionadas entre si por equilíbrios químicos, multiplicadas pela distribuição desta espécies (α_j):

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \cdot \mu_j \quad [2.3]$$

A mobilidade eletrosmótica (μ_{eo}) por ε_r que é a permissividade da solução (usualmente tomada como a permissividade do solvente puro), ε_o é a permissividade do vácuo, ζ potencial zeta e η é a viscosidade dinâmica da solução, na qual assume-se que a razão entre permissividade e a viscosidade é independente do campo elétrico na dupla camada, Equação 2.4.

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon_r \cdot \varepsilon_o \cdot \zeta}{\eta} \quad [2.4]$$

2.1.4 – Modos de separação em eletroforese capilar

Durante décadas passadas, a eletroforese capilar (CE) e suas muitas variantes, tal como a eletroforese capilar em zona (capillary zone electrophoresis, CZE), cromatografia eletrocinética micelar (electrokinetic chromatography, MEKC), eletroforese capilar em gel (capillary gel electrophoresis, CGE), eletrocromatografia capilar (capillary electrochromatography, CEC), isotacoforese (capillary isotachopheresis, CITP) e focalização isoelétrica (CIEF, capillary isoelectric focusing) tem demonstrado serem técnicas de grande poder de separação⁵⁻⁸.

Eletroforese Capilar Zona (CZE)⁹

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

A CZE é um dos modos de separação eletroforética mais usados na prática, provavelmente em razão da facilidade de sua implementação, e otimização das condições experimentais. Em CZE, o tubo capilar é simplesmente preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes. A separação ocorre como resultado de duas estratégias: maximizar as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos e minimizar as causas de alargamento das zonas.

As equações tradicionais que descrevem resolução, eficiência e tempo de migração em CZE incorporam o fenômeno de difusão como única causa de alargamento das zonas' e podem ser escritas como:

$$Rs_{i,i+1} = \frac{1}{4\sqrt{2}}(\mu_i - \mu_{i+1}) \cdot \left(\frac{v}{D(\mu_{m\u00e9dia} + \mu_{eo})} \right)^{1/2} \quad [2.5]$$

$$N = \frac{L_{ef}(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}{2DL_{tot}} \quad [2.6]$$

$$t_i = \frac{L_{ef} \cdot L_{tot}}{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \cdot V} \quad [2.7]$$

onde μ_i e μ_{i+1} s\u00e3o as mobilidades aparentes de dois solutos eluindo em posi\u00e7\u00f5es adjacentes, $\mu_{m\u00e9dia}$ \u00e9 a mobilidade m\u00e9dia dos solutos, μ_{ep} \u00e9 a mobilidade eletrofor\u00e9tica do soluto i , μ_{eo} \u00e9 a mobilidade do fluxo eletrosm\u00f3tico, V \u00e9 a diferen\u00e7a de potencial aplicada, D \u00e9 a m\u00e9dia dos coeficientes de difus\u00e3o dos dois solutos, L_{tot} \u00e9 o comprimento do capilar, e o L_{ef} \u00e9 a dist\u00e2ncia do ponto de inje\u00e7\u00e3o \u00e0 posi\u00e7\u00e3o do detector.

As equa\u00e7\u00f5es [2.5] e [2.6] indicam que o uso de tens\u00f5es elevadas \u00e9 vantajoso, implicando em um ganho de resolu\u00e7\u00e3o e efici\u00eancia, assim como a diminui\u00e7\u00e3o do tempo de an\u00e1lise. Outra observa\u00e7\u00e3o importante \u00e9 que, em separa\u00e7\u00f5es dif\u00edceis, a resolu\u00e7\u00e3o de pares de solutos migrando muito pr\u00f3ximos pode ser melhorada pelo ajuste da magnitude do fluxo eletrosm\u00f3tico. Quando a mobilidade eletrosm\u00f3tica for igual, mas de sinal oposto \u00e0 mobilidade dos solutos, um ganho de resolu\u00e7\u00e3o \u00e9 alcan\u00e7ado [2.5]. As penalidades para este tipo de estrat\u00e9gia, no entanto, s\u00e3o perda de efici\u00eancia [2.6] e aumento consider\u00e1vel no tempo de an\u00e1lise [2.7].

Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

A cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), foi introduzida por Terabe e colaboradores em 1984, voltada para separação de misturas contendo solutos neutros¹⁰. Em MEKC, agentes tensoativos iônicos (dodecilsulfato de sódio – SDS), em condições favoráveis a formação de micelas são adicionados ao eletrólito de corrida, proporcionando um sistema cromatográfico de duas fases. Desse modo a eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada eletrosmoticamente pela ação do campo elétrico, enquanto que as micelas as quais representam a fase secundária, é transportada pela combinação da eletroforese e eletrosmose. A partição diferenciada de solutos neutros entre as duas fases é responsável pela seletividade da separação.

Eletroforese Capilar em gel (CGE)

Esta técnica é muito utilizada na separação de proteínas e DNA, por diferenças de tamanho relativo. A separação ocorre preenchendo-se o capilar com uma matriz polimérica. A grande vantagem sobre a eletroforese clássica em placas é a obtenção de resultados quantitativos mais exatos, tempo de análise e a possibilidade de automação do processo.

Eletrocromatografia capilar (CEC)

CEC é uma técnica recente de separação que combina as vantagens da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com a eletroforese capilar (CE). Nesta técnica, o transporte do solvente (fase móvel) é feito através do fluxo eletrosmótico ao longo da coluna. Os capilares utilizados para esse tipo de separação são recheados com uma fase estacionária, como C18 (octadecilsilica), monólitos, etc.

Isotacoforese capilar (CITP)

A isotacoforese é uma técnica em que são empregados dois tipos de eletrólito. Os solutos ficam confinados entre duas regiões compostas por estes eletrólitos. O primeiro eletrólito, que apresenta mobilidade eletroforética maior que todos os componentes da amostra é chamado de eletrólito líder. O segundo eletrólito, que apresenta mobilidade eletroforética menor que todos os componentes da amostra é conhecido como eletrólito terminador. Quando o potencial é aplicado cria-se um estado estacionário no qual as zonas dos analitos migram em ordem decrescente de mobilidade, mas com velocidade constante e única. Outro aspecto importante é que todas as zonas adotam a concentração do eletrólito líder. Desse modo esse fenômeno pode ser utilizado para concentração de amostras no capilar.

Focalização isoelétrica (CIEF)

Técnica eletroforética para separação de analitos anfóteros de acordo com seu ponto isoelétrico, através da aplicação de um campo elétrico ao longo de um gradiente de pH gerado no capilar.

2.2 – Eletroforese Capilar acoplada a espectrometria de massas (CE-MS)

A espectrometria de massas é uma técnica analítica poderosa muito utilizada na identificação de compostos desconhecidos, quantificação de materiais conhecidos e elucidação de propriedades químicas e estruturais de moléculas. Basicamente um espectrômetro de massas é dividido em uma fonte de íons, um analisador da relação carga/massa deste íons e um detector.

O princípio em que a técnica se baseia é simples e envolve a geração de íons os quais são depois detectados, entretando a sofisticação surge nos métodos empregados na geração destes íons e no modo de analisá-los. Com o objetivo de se adquirir resultados sensíveis e seletivos a espectrometria de massas normalmente é utilizada em combinação com técnicas cromatográficas (GC e HPLC) e a eletroforese capilar (CE)¹¹⁻¹⁵.

No caso de técnicas que operam em meio líquido como HPLC e CE, é necessária a utilização de uma fonte de ionização que possa transmitir moléculas da fase líquida para a fase gasosa e ao mesmo tempo transferir carga a estas moléculas. A técnica de ionização por electrospray (ESI) é a mais utilizada. Basicamente três características fazem com que o electrospray seja considerado uma técnica distinta das outras técnicas de ionização:

i) capacidade para produzir íons multiplamente carregados, com número de cargas elevado, reduzindo assim, a razão massa/carga (m/z), de tal modo que seja possível analisar compostos de elevada massa molecular;

ii) as amostras a serem analisadas devem ser introduzidas em solução, o que permite o acoplamento com diversas técnicas de separação;

iii) e o fato de ser o electrospray uma técnica de ionização suave que permite que as interações não covalentes entre moléculas que existem em solução sejam preservadas na fase gasosa^{6,7}.

2.2.1 – Formação de íons⁸

A produção de íons em electrospray requer essencialmente dois passos, dispersão de gotas altamente carregadas quase à pressão atmosférica seguida de condições que permitam a evaporação da gota. A ionização por electrospray não é um método de ionização propriamente dita, mas um método de transferência de um íon da fase líquida para a fase gasosa, e a ionização de moléculas neutras em fase líquida é um processo secundário.

A técnica de ionização por electrospray é assim chamada devido à formação de um spray eletrostático, este processo ocorre devido à passagem de uma solução contendo íons por um capilar onde uma alta tensão é aplicada (1000 a 5000 V), com isso a solução é nebulizada eletrostaticamente com formação de pequenas gotas altamente carregadas. A nebulização da solução é em alguns casos facilitada pela ajuda de um gás nebulizador (normalmente nitrogênio). Posteriormente as moléculas são direcionadas a uma região de alto vácuo onde ocorre a separação dos íons e conseqüentemente a sua detecção em um analisador de massas.

2.2.2 – Acoplamento CE-MS⁹

O acoplamento entre CE-MS é diferente dos acoplamento existentes entre o LC-MS. Para que as separações por CE ocorram uma alta tensão é aplicada entre as extremidades do capilar para que a separação ocorra, portanto em qualquer equipamento de CE-MS, o circuito elétrico do CE precisa ser fechado para que a separação ocorra corretamente. Em separações que não envolvem espectrometria de massas, o contato é fechado mantendo soluções condutoras nas duas extremidades do capilar durante a separação. No entanto, em CE-MS a extremidade possui uma combinação de um líquido auxiliar e um gás; o líquido é necessário por manter o contato fechado para que ocorra a separação por CE e um gás nebulizador (normalmente nitrogênio) é responsável pela formação do spray durante o processo de dessolvatação e ionização da amostra.

A forma mais utilizada para a junção das duas técnicas é de uma interface (Figura 2.3), onde um sistema formado por três capilares, onde o mais ao centro é o capilar de separação do CE (A), o segundo é o responsável por fechar o contato do CE, constituído por uma solução condutora que leva o nome de líquido auxiliar (sheath liquid) (B), bombeado em uma vazão que pode varia de 2 a 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e o terceiro o gás nebulizador (C) responsável pela dessolvatação do líquido que sai do capilar.

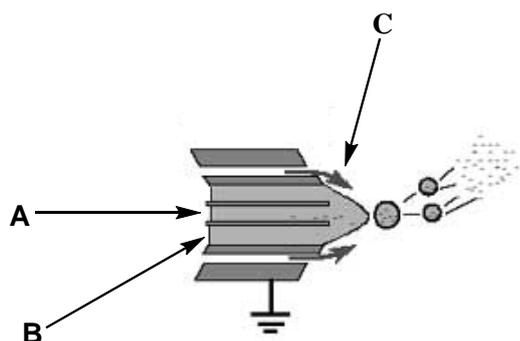


Figura 2.3 – Representação esquemática da fonte de ionização no CE-ESI-MS.

Em um sistema CE-ESI-MS o analito ao sair do capilar sofre ionização a pressão atmosférica em P1, passando por um capilar aquecido, sendo transferido para regiões de pressões reduzidas P2 e P3 até uma zona de alto vácuo P4, passando pelos octapolos por onde ocorre a separação dos íons, chegando no ion trap, que funciona como uma “armadilha de íons”, que possui como função concentrar os íons que estão passando pelos octopolos para uma melhoria no sinal e consequentemente sua detecção (Figura 2.4).

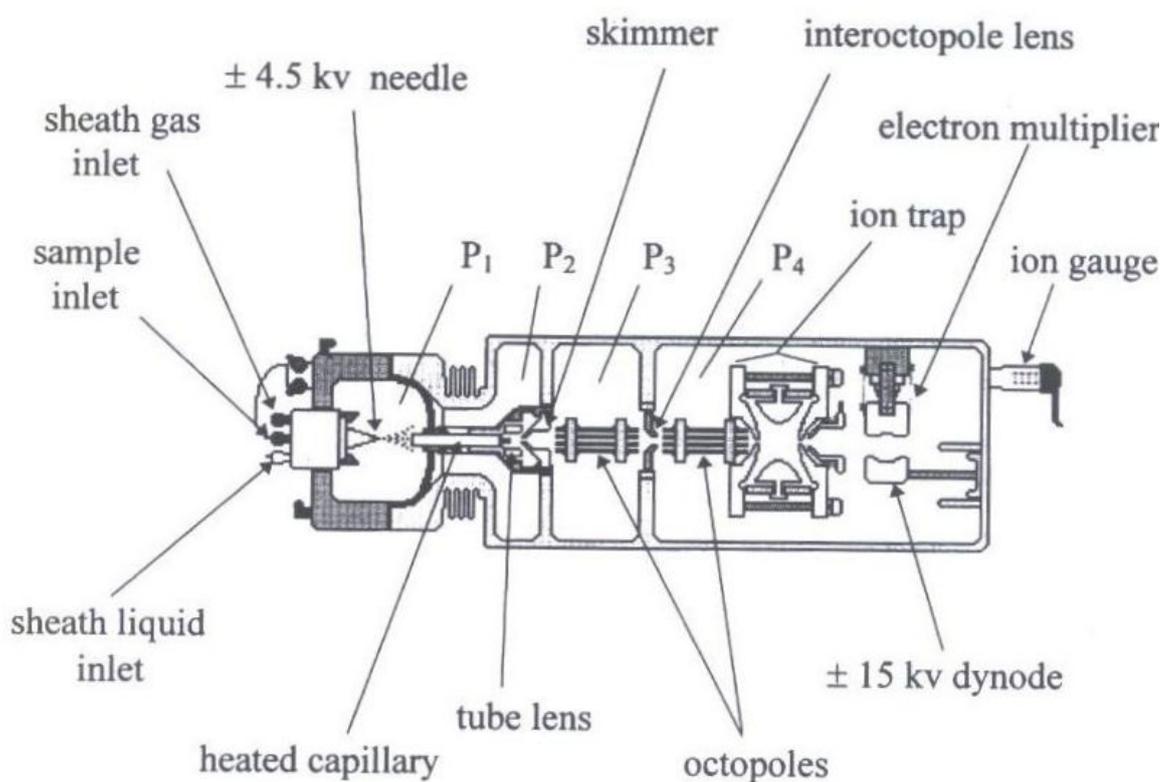


Figura 2.4 – Representação de um equipamento de CE-ESI-MS⁷.

2.3 – Análise de antiretrovirais por eletroforese capilar

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das técnicas mais utilizadas na análise de anti-retrovirais, sendo aplicada com eficiência na análise formulações farmacêuticas¹⁷⁻¹⁹, produtos de degradação e amostra biológicas²⁰⁻²⁵. Porém em alguns casos como soro e plasma, devido às concentrações existentes serem baixas e devido à complexidade da matriz, técnicas de *clean-up* e pré-concentração utilizando extração em fase sólida (SPE), são muito empregadas. Outra forma que vem sendo muito utilizada no aumento da sensibilidade é o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas, combinando assim as vantagens da separação cromatográfica e a alta sensibilidade e especificidade da espectrometria de massas^{26,27}.

A eletroforese capilar (CE) vem se destacando nos últimos anos como uma poderosa ferramenta analítica para separação de um grande número de substâncias, incluindo compostos farmacêuticos. Esta técnica vem sendo amplamente explorada devido à possibilidade de se obter análises de custo reduzido e tempo de análise relativamente pequeno, quando comparado com outras técnicas²⁸⁻³⁰.

Poucos são os métodos eletroforéticos existentes na literatura voltados à análise de antiretrovirais. Muitos artigos descrevem o desenvolvimento e validação de métodos analíticos aplicados a amostras de soro, envolvendo procedimentos de extração em fase sólida⁸⁻¹³. Fan et al¹¹ desenvolveram métodos para determinação simultânea de antiretrovirais em amostras de soro, utilizando extração em fase sólida e separação através do modo CZE, com um tempo de análise inferior a 10 minutos, atingindo limites de detecção que variaram de 0,2 a 0,9 µg.mL⁻¹. Em um estudo posterior Fan e colaboradores¹² realizaram a separação de outros anti-HIVs, por

MEKC, com um tempo de análise inferior a 14 minutos, atingindo limites de detecção que variaram de 0,3 – 0,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Recentemente Tuan et al¹³ desenvolveram um método para a determinação simultânea de 15 antiretrovirais em amostras de soro por MEKC, com um tempo de análise de aproximadamente 10 minutos. Porém o método proposto mostra perturbações na linha de base, as quais podem comprometer a quantificação. Pereira e colaboradores⁸ demonstraram a separação de 9 antiretrovirais através de uma metodologia mais simples e robusta podendo ser facilmente aplicada em análises de rotina de materiais biológicos. A separação foi atingida um utilizando um eletrólito constituído de 10 mmol.L^{-1} de tetraborato de sódio (TBS), 20 mmol.L^{-1} de dodecilsulfato de sódio (SDS), 30 % de acetonitrila e 5 % etanol.

Uma nova possibilidade que vem sendo muito explorada é o acoplamento da eletroforese capilar com a espectrometria de massas. Este tipo de acoplamento permite uma melhoria significativa na detectabilidade dos métodos, e ainda uma identificação inequívoca dos analitos¹⁴⁻¹⁶.

A aplicação da CE para análise de formulações farmacêuticas vem sendo pouco explorada, os métodos existentes mostram tempos de análise extremamente pequenos, quando comparado com outras técnicas, demonstrando um grande potencial da técnica muito pouco explorado¹⁷⁻¹⁹.

2.4 Referências

1. Landers, J. P., Handbook of Capillary Electrophoresis, CRC Press, New York, NY, 1997, p. 567.
2. Mikkers, F. E. P., F. M. Everaerts, *et al.* High-Performance Zone Electrophoresis. Journal of Chromatography, v.169, n.Feb, p.11-20. 1979.
3. Kasicka, V. Recent advances in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides. Electrophoresis. v.24, p.4013 – 4046. 2003
4. Tavares, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. Química Nova, v.19, n.2, p173-181.
5. Kuhr, W. G., Monnig, C. A. Capillary Electrophoresis. Analytical Chemistry, v.64, p.389-407R. 1992.
6. Monnig, C. A., Kennedy, R. T. Capillary Electrophoresis. Analytical Chemistry, v.66, p.280-314R.
7. Grossman, P. D., Colburn, J. C., *Capillary Electrophoresis-Theory and Practice* Academic Press: San Diego. CA. 1992.
8. Silva, J. A. F.; Coltro, W. K. T.; Carrilho, E.; Tavares, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. Química Nova, v.30, p.740-744. 2007
9. Tavares, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. Química Nova, v.20, n.5, p.493 – 511. 1997.
10. Terabe, S.; Matsubara, N.; Ishihama, Y.; Okada, Y. Microemulsion electrokinetic chromatography: comparison with micellar electrokinetic chromatography. Journal of Chromatography A, v.608, p.23 - 29. 1992.
11. Visky, D.; Jimidar, I.; Ael, W. V.; Vennekens, T.; Redlich, D.; Smet, M. de. Capillary electrophoresis-mass spectrometry in impurity profiling of pharmaceutical products. Electrophoresis, v.26, p.1541-1549. 2005.
12. Ohnesorge, J.; Neusub, C.; Watzig, H. Quantitation in capillary electrophoresis-mass spectrometry. Electrophoresis, v.26, p.3973 – 3987. 2005.
13. Crotti, A. E. M.; Vesseccchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. Química Nova, v.29, p.287-292. 2006.
14. Cech, N. B.; Enke, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. Mass Spectrometry Reviews, v.20, p.362-387. 2001.

15. Macià, A., Borrul, F., Calull, M., Aguilar, C.; Determination of some acidic drugs and sewage treatment plant waters by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, v.25, p.3441 – 3449.
16. Cole, R.B.; In: *Electrospray Mass Spectrometry*; John Wiley & Sons, New York, Inc Chinchester, (1997).
17. Gross, J. H.; In: *Mass Spectrometry*; Springer, New York, 2004.
18. Moraes, M. C.; Lago, C. L do; Espectrometria de Massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Química Nova*, v.26, p.556 – 563. 2003.
19. *Electrospray ionization mass spectrometry*
http://www.colorado.edu/chemistry/chem5181/MS_ESI_Gilman_Mashburn.pdf,
acessada Maio 2007.
20. Kapoor, N., S. Khandavilli, *et al.* Simultaneous determination of lamivudine, stavudine and nevirapine in antiretroviral fixed dose combinations by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v.570, n.1, Jun 7, p.41-45. 2006.
21. Sarkar, M., S. Khandavilli, *et al.* Development and validation of RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for the quantitative estimation of antiretroviral drugs in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.830, n.2, Jan 18, p.349-354. 2006.
22. Kapoor, N., S. Khandavilli, *et al.* Simultaneous determination of lamivudine and stavudine in antiretroviral fixed dose combinations by first derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.41, n.3, Jun 7, p.761-765. 2006.
23. Choi, S. O., N. L. Rezk, *et al.* High-performance liquid chromatography assay for the determination of the HIV-protease inhibitor tipranavir in human plasma in combination with nine other antiretroviral medications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.43, n.4, Mar 12, p.1562-1567. 2007.
24. Dickinson, L., L. Robinson, *et al.* Simultaneous determination of HIV protease inhibitors amprenavir, atazanavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.829, n.1-2, Dec 27, p.82-90. 2005.
25. Notari, S., A. Bocedi, *et al.* Simultaneous determination of 16 anti-HIV drugs in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.831, n.1-2, Feb 2, p.258-266. 2006.

26. Faux, J., N. Venisse, *et al.* Simultaneous determination of six HIV protease inhibitors, one metabolite, and two non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human plasma by isocratic reversed-phase liquid chromatography after solid-phase extraction. Chromatographia, v.58, n.7-8, Oct, p.421-426. 2003.
27. Dailly, E., F. Raffi, *et al.* Determination of atazanavir and other antiretroviral drugs (indinavir, amprenavir, nelfinavir and its active metabolite M8, saquinavir, ritonavir, lopinavir, nevirapine and efavirenz) plasma levels by high performance liquid chromatography with UV detection. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.813, n.1-2, Dec 25, p.353-358. 2004.
28. Quevedo, M. A., S. A. Teijeiro, *et al.* Quantitative plasma determination of a novel antiretroviral derivative of zidovudine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v.385, n.2, May, p.377-384. 2006.
29. Koal, T., H. Burhenne, *et al.* Quantification of antiretroviral drugs in dried blood spot samples by means of liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, v.19, n.21, p.2995-3001. 2005.
- d30. Compain, S., D. Schlemmer, *et al.* Development and validation of a liquid chromatographic/tandem mass spectrometric assay for the quantitation of nucleoside HIV reverse transcriptase inhibitors in biological matrices. Journal of Mass Spectrometry, v.40, n.1, Jan, p.9-18. 2005.
31. Shaw, C. J. in: L. Ohannesian, A. J. Streeter (Eds), Handbook of Pharmaceutical Analysis, Marcel Dekker, New York, 2002, p. 313.
32. Altria, K. D., Capillary Electrophoresis Guide Book – Principles, Operation and Application, Human Press, Totowa, NJ, 1996, p. 265.
33. Landers, J. P., Handbook of Capillary Electrophoresis, CRC Press, New York, NY, 1997, p. 567.
34. Pereira, E. A., G. A. Micke, *et al.* Determination of antiretroviral agents in human serum by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A, v.1091, n.1-2, Oct 14, p.169-176. 2005.
35. Gutleben, W., K. Scherer, *et al.* Separation of 11 protease and reverse transcriptase inhibitors by capillary zone electrophoresis. Journal of Separation Science, v.26, n.12-13, Aug, p.1198-1202. 2003.
36. Fan, B. e J. T. Stewart. Determination of lamivudine/didanosine/saquinavir in human serum using capillary zone electrophoresis. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v.25, n.2, p.241-249. 2002.
37. Fan, B. e J. T. Stewart. Determination of stavudine/didanosine/saquinavir and stavudine/didanosine/efavirenz in human serum by micellar electrokinetic

chromatography (MEKC). Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v.25, n.6, p.937-947. 2002.

38. Fan, B. e J. T. Stewart. Determinations of zidovudine/didanosine/nevirapine and zidovudine/didanosine/ritonavir in human serum by micellar electrokinetic chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.30, n.4, Nov 7, p.955-960. 2002.

39. Tuan, N. D., W. Gutleben, *et al.* Simultaneous separation of fifteen approved protease and reverse transcriptase inhibitors for human immunodeficiency virus therapy by capillary electrophoresis. Electrophoresis, v.24, n.4, Feb, p.662-670. 2003.

40. Liu, C. C., J. S. Huang, *et al.* Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry of nucleosides and nucleotides: Application to phosphorylation studies of anti-human immunodeficiency virus nucleosides in a human hepatoma cell line. Electrophoresis, v.26, n.7-8, Apr, p.1424-1431. 2005.

41. Cahours, X., H. Dessans, *et al.* Determination at ppb level of an anti-human immunodeficiency virus nucleoside drug by capillary electrophoresis-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, v.895, n.1-2, Oct 20, p.101-109. 2000.

42. Fan, B., M. G. Bartlett, *et al.* Determination of lamivudine/stavudine/efavirenz in human serum using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry with ionization polarity switch. Biomedical Chromatography, v.16, n.6, Sep, p.383-389. 2002.

43. Prado, M. S. A., E. R. M. Kedor-Hackmann, *et al.* Capillary electrophoretic method for determination of protease inhibitor indinavir sulfate used in human immunodeficiency virus therapy. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.34, n.2, Feb 4, p.441-450. 2004.

44. Pereira, E. A., G. A. Micke, *et al.* Development and validation of a capillary electrophoresis method for the determination of sulfate in indinavir sulfate raw material. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.17, n.2, Mar-Apr, p.251-256. 2006.

45. Sekar, R. e S. Azhaguvel. Simultaneous determination of HIV-protease inhibitors lamivudine and zidovudine in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.39, n.3-4, Sep 15, p.653-660. 2005.

CAPÍTULO 3
OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos passíveis de aplicação na análise de medicamentos disponíveis para o tratamento da AIDS, bem como a validação dos mesmos de acordo com os protocolos internacionais e nacionais. Aborda-se neste trabalho também o desenvolvimento de um método aplicado a amostras biológicas, utilizando à eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas.

CAPÍTULO 4
**METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE NEVIRAPINA
EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

4.1 – Introdução

A nevirapina (1-ciclopropil-5,11-dihidro-4-metil-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4] diazepin-6-ona) foi o primeiro medicamento de sua classe a ser aprovado pela FDA em 1996, sendo introduzida no mercado como Viramune® (Boehringer Ingelheim). Estudos sugerem que a atividade da nevirapina se passa através da alteração química da ligação da polimerase com outros inibidores análogos de nucleotídeos fazendo com que os análogos se liguem a transcriptase, de forma irreduzível mas não produtiva, bloqueando a síntese de novos vírus¹⁻³

Principais efeitos colaterais

A utilização deste fármaco possui como inconveniente o surgimento de uma reação alérgica, a qual pode provocar manchas vermelhas no corpo e coceira. Podendo afetar também a boca, os lábios e genitais. Na maioria dos casos estas reações alérgicas tendem a desaparecer com o tratamento contínuo. Outros efeitos colaterais incluem: dores de cabeça, enjoos, vômitos, febre e hepatite³.

4.2 – Instrumentação

Os experimentos foram conduzidos em dois sistemas de eletroforese capilar (modelo P/ACE 5510, Beckman Coulter Instruments, Fullerton, CA, EUA), equipado com um sistema de detecção UV/VIS e *software* (Beckman P/ACE System Gold® Software) e (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos e *software* (HP ChemStation, ver A.08.03) para tratamento e aquisição de dados. O equipamento Beckman possui sistema de refrigeração do capilar por circulação de líquido refrigerante enquanto que o Agilent utiliza ar forçado para o controle da temperatura interna do capilar.

Os experimentos realizados no desenvolvimento deste método utilizando-se CZE, foram feitos utilizando capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), revestidos externamente com poliimida, com 75 µm de diâmetro interno, 27,0 cm de comprimento total (19,4 cm de comprimento efetivo) para o instrumento da Beckman e 31,5 cm (23,0 cm de comprimento efetivo) para o equipamento da Agilent. As lavagens de condicionamento inicial do capilar, foram realizadas por pressão de aproximadamente 20 psi, com passagem de hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹ por 30 minutos, seguidos de 30 minutos de água deionizada e 10 minutos de eletrólito de corrida. No intervalo entre as corridas o capilar foi recondicionado com lavagens de 1 minuto de eletrólito e no término das análises 5 minutos de hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹ e 5 minutos de água deionizada para a limpeza do capilar.

4.3 – Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico e a água deionizada purificada através de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). O padrão dos fármacos nevirapina e diazepam foram fornecidos pela Farmanguinhos – FIOCRUZ, RJ. Soluções padrão estoque foram preparadas em água com concentração aproximada de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para a nevirapina e o diazepam, e armazenadas sob refrigeração (4°C). Foram preparadas soluções estoque dihidrogenofosfato de sódio (Merck, Rio de Janeiro, RJ) na concentração de 100mmol.L^{-1} . O eletrólito utilizado na metodologia desenvolvida foi preparado diariamente através das respectivas diluições das soluções estoque com água deionizada e o pH ajustado com ácido fosfórico.

4.4 – Preparo das amostras

Para a análise de nevirapina vinte comprimidos das amostras de Nevimune (Laob Bioquímicos Ltda – amostra A); Viramune (Boehringer Ingelheim – amostra B) e do genérico Nevirapina (Farmanguinhos – FIOCRUZ – amostra C), foram pesados em balança analítica e em seguida triturados com o auxílio de um almofariz e pistilo.

Uma porção equivalente 20 mg do ativo de cada amostra foi pesada em balança analítica e em seguida transferida para um balão volumétrico de 100 mL, O material foi dissolvido adicionando 10 mL de acetonitrila e completando-se o volume com água deionizada. Após dissolução do material este foi filtrado utilizado-se membranas de 0,45 μm (Millipore). Alíquotas de 5,0 mL destas soluções e 1,0 mL de diazepam ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram transferidas em balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com água deionizada. As concentrações finais foram de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a nevirapina e o diazepam, respectivamente.

4.5 – Desenvolvimento da metodologia

A metodologia proposta anteriormente para análise de formulações farmacêuticas contendo lamivudina como princípio ativo, apesar de ter sido desenvolvida por CZE, não se aplica para este composto em decorrência do tempo de análise longo ocasionado pela composição do eletrólito, que interfere na migração do mesmo. Procurou-se então desenvolver uma nova metodologia rápida e passível de aplicação em amostras reais. De acordo com a estrutura da nevirapina (Figura 4.1 – A), observa-se que a presença de grupos amina, estes grupamentos podem facilmente serem ionizados em soluções ácidas ($\text{pH} < 2,5$). Uma estratégia inicial foi de utilizar eletrólitos contendo diferentes concentrações de dihidrogeno fosfato de sódio ($10 - 30 \text{ mmol. L}^{-1}$) com o pH ajustado para 2,5 com a adição de ácido fosfórico. Observou-se que concentrações superiores a 20 mmol.L^{-1} ocasionavam um aumento significativo na corrente devido ao aumento da força iônica do eletrólito, com isso otimizou-se a concentração do eletrólito, e outros parâmetros como tensão aplicada, e comprimento do capilar, a fim de se obter uma boa separação com o menor tempo de análise. Com estes parâmetros otimizados, o eletrólito de corrida foi composto de 10 mmol.L^{-1} de tampão fosfato de sódio, $\text{pH} = 2,5$, ajustado com ácido fosfórico, tensão aplicada de 25 kV, tempo de injeção da amostra de 0,5 psi por 5 s e $\lambda = 200 \text{ nm}$.

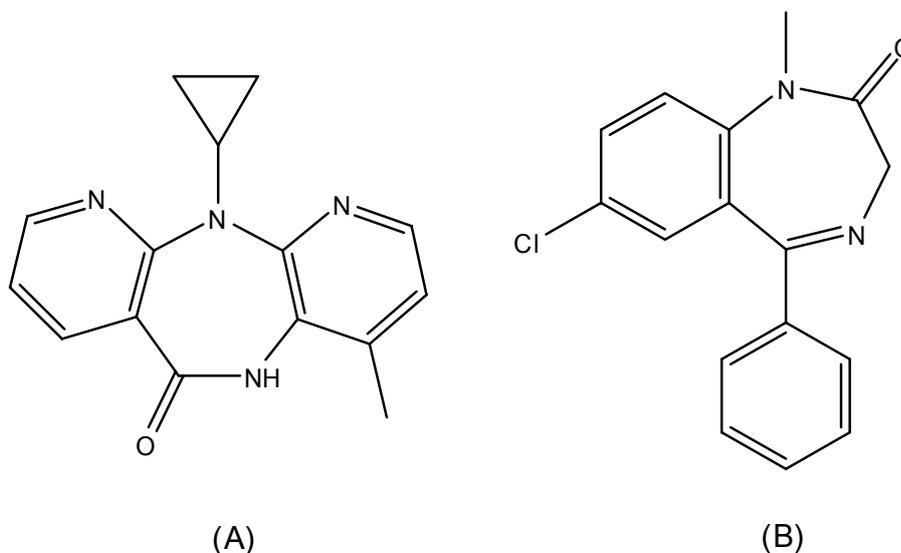


Figura 4.1 – Estrutura química da nevirapina (A) e do diazepam (B).

A escolha do padrão interno foi feita buscando-se um analito com características de ionização (pK_a) e mobilidade próxima a do fármaco em estudo. Dentre os diversos fármacos disponíveis no laboratório observou-se que o diazepam (Figura 4.1 – B) poderia ser utilizado como padrão interno sem interferir na análise da nevirapina, uma vez que em um $pH \leq 2,5$, a molécula encontra-se carregada positivamente através da protonação do nitrogênio presente em seu anel. A Figura 4.2, mostra um eletroferograma de uma mistura de padrões de nevirapina e o diazepam (padrão interno).

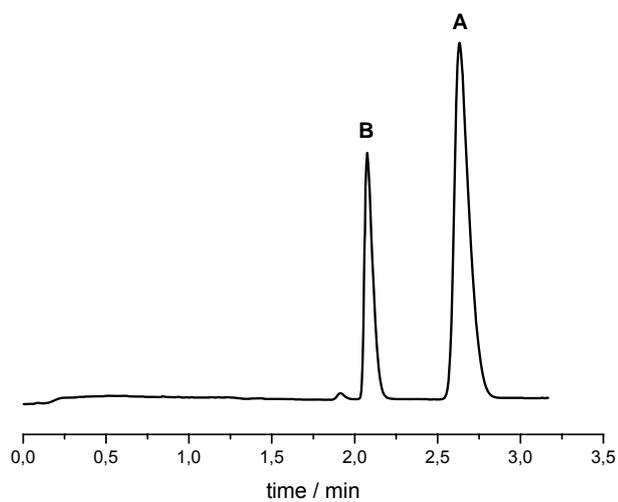


Figura 4.2 – Eletroferograma de uma solução padrão de nevirapina - **A** ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e diazepam - **B** ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), eletrólito: 10 mmol.L^{-1} de tampão fosfato ($\text{pH}=2,5$), tempo de injeção de 5 s ($0,5 \text{ psi}$), voltagem de 25 kV e $\lambda = 200 \text{ nm}$.

4.6 – Validação do método desenvolvido

4.6.1 – Linearidade, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Para a construção da curva analítica soluções padrão de nevirapina foram injetadas no intervalo de concentração entre 80 – 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contendo 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão interno. A curva analítica foi construída com base na razão das áreas dos picos (nevirapina / diazepam - PI) versus a concentração (Figura 4.3), e posterior regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A Tabela 4.1 compila os parâmetros referentes à regressão linear. Observa-se que o método apresentou linearidade com $r > 0,999$ na faixa de concentração estudada. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para a lamivudina foram 1,4 e 4,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Os critérios utilizados para determinar o LOD e LOQ foram baseados nos parâmetros referentes à regressão linear.

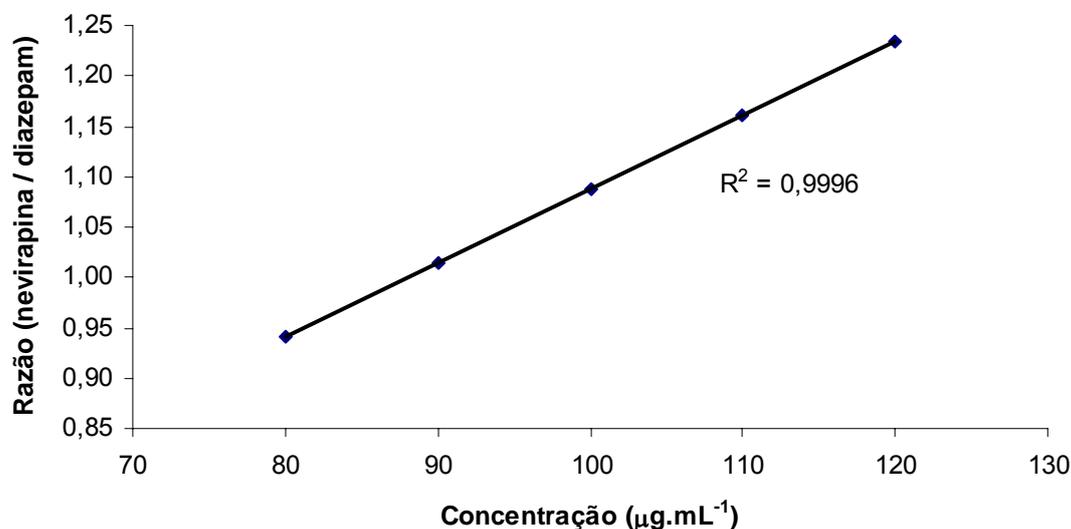


Figura 4.3 – Curva analítica para nevirapina.

Tabela 4.1 – Validação do método para nevirapina em relação a linearidade, limite de detecção e quantificação.

<i>Parâmetros</i>	<i>Dados estatísticos</i>
Faixa linear ^a ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	80 – 120
Coeficiente linear	0,3542
Coeficiente angular (S)	0,0207
Coeficiente de correlação (r)	0,9996
Erro da regressão (s)	0,0089
Limite de detecção ^b ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1,4
Limite de quantificação ^c ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	4,3

^a cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível

^b LOD = 3,3(s/S)

^c LOQ = 10(s/S)

4.5.2 – Precisão do método – intra-ensaio

A precisão foi determinada através da análise das amostras em três níveis de concentração (80, 100 e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com três determinações para cada nível. A repetibilidade foi demonstrada pela média dos coeficientes de variação (%CV), onde o valor obtido foi de 1,5. Os dados apresentados mostram uma boa precisão uma vez que os valores não devem ser superiores a 2 %⁴.

Tabela 4.2 – Precisão do método - Repetibilidade

Concentração amostra ^a ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% CV
80,0	1,2
100,00	1,4
120,00	1,8
CV ^b (%)	1,5

^a Três determinações para cada nível

^b CV (nove determinações)

4.6.3 – Testes de recuperação

Para se determinar a exatidão do método, testes de recuperação foram realizados de acordo com os procedimentos adotados pelos órgãos regulamentadores. Quantidades conhecidas de nevirapina foram adicionadas em amostras comerciais e analisadas pelo método proposto, de acordo com a Tabela 4.3. Na Tabela 4.3 pode ser observado que os valores da recuperação média obtidos para a nevirapina estão entre 97,2 a 102,7%, a média dos valores obtidos devem estar em torno de $100 \pm 2\%$ para cada concentração na faixa estudada.

Tabela 4.3 – Teste de recuperação de padrão de nevirapina adicionado a uma amostra comercial e analisadas pelo método proposto.

Amostra	Amostra comercial adicionada	Padrão adicionado	Padrão encontrado	Recuperação ^a (%)
A	40	40	39,9	99,7
A	50	50	51,2	102,5
A	60	60	59,9	99,9
B	40	40	40,1	100,3
B	50	50	50,4	100,7
B	60	60	61,3	102,1
C	40	40	40,5	101,4
C	50	50	49,8	99,6
C	60	60	60,7	101,1

^a – média de três determinações

4.6.4 – Aplicação do método em amostras

Para demonstrar a aplicabilidade da metodologia proposta, nas condições anteriormente descritas, amostras contendo nevirapina como princípio ativo foram analisadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.4 e na Tabela 4.4.

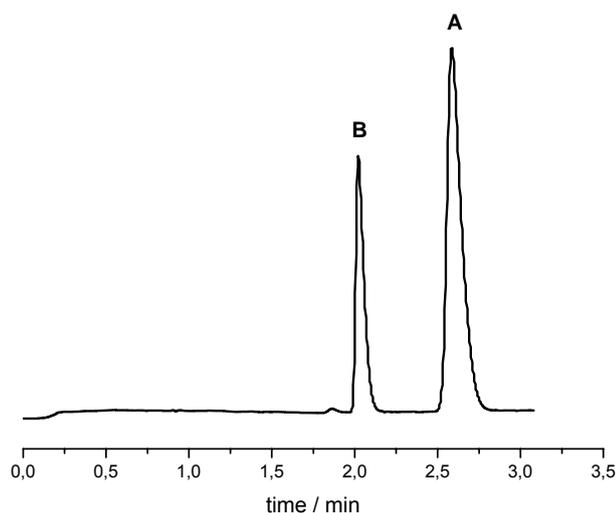


Figura 4.4 – Eletroferograma da amostra A de nevirapina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e diazepam ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (PI), Eletrólito 10 mmol.L^{-1} tampão fosfato de sódio, $\text{pH} = 2,5$ ajustado com ácido fosfórico. Tempo de injeção 5 s (0,5 psi), 25 kV, $\lambda = 200 \text{ nm}$.

Tabela 4.4 – Resultados das análises de lamivudina em formulações farmacêuticas.

Resultados	P/ACE 5100		
	A ^a	B ^a	C ^a
Quantidade declarada (mg/cápsula)		200	
Quantidade encontrada (mg/cápsula)	198.65 ± 0.96	195.60 ± 1.44	198.23 ± 0.84
Pureza (%)	99.32	97.80	99.11
% CV. (%)	0.48	0.74	0.42
HP ^{3D} CE			
Quantidade declarada (mg/cápsula)		200	
Quantidade encontrada (mg/cápsula)	198.88 ± 1.33	196.33 ± 1.63	198.07 ± 1.48
Pureza (%)	99.44	98.16	99.03
% CV. (%)	0.67	0.83	0.75

^a média de três determinações

4.6.5 – Robustez

A robustez do método proposto foi avaliada através da comparação dos resultados experimentais obtidos utilizando dois equipamentos (Tabela 4.4). Testes de significância foram realizados para comparar (Tabela 4.5). Realizando-se um teste *F* com os valores, observa-se que não existe uma diferença significativa entre os resultados obtidos entre os dois equipamentos, a um nível de confiança de $P = 95\%$.

Tabela 4.5 – Comparação da precisão entre os valores obtidos em dois equipamentos.

Amostras	Precisão
	valor de F calculado
A	1,39
B	1,13
C	1,76

Valor tabulado de F, $P = 95\%$, $F_{2,2} = 19,00$ (ref. [26])

4.6 – Conclusão

Um método novo e rápido por CE para análise de nevirapina em formulações farmacêuticas foi desenvolvido e validado. A robustez do método proposto avaliada através da comparação entre dois equipamentos distintos, mostra que este pode ser facilmente implementado em laboratórios farmacêuticos para análise de rotina em formulações farmacêuticas e matéria-prima.

4.7 – Referências

1. Palaniappan, C.; Fay, P. J.; Bambara, R. A. Nevirapine alters the cleavage specificity of ribonuclease H of Human Immunodeficiency Virus-1 Reverse. *J. Biol. Chem.* v.270, no.9, 4861-4869.
2. http://www.spcd.org.br/medicamentos_nevirapina.htm, acessado em Maio 2007.
3. Food and Drug Administration (FDA), www.fda.gov/cder/foi/label/2005/20636s025,20933s014lbl.pdf , acessada em Maio 2007.
4. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, p.771 – 780. 2004.

CAPÍTULO 5
**METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE LAMIVUDINA
EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

5.1 – Introdução

A lamivudina (2',3'-dideoxi-3'-tiocitidina) foi aprovada em 1995 para o uso combinado com o AZT (zidovudina). Possui um mecanismo de ação semelhante aos demais análogos nucleosídeos, onde são fosforiladas por enzimas quinases celulares, gerando metabólitos ativos que inibem a transcriptase reversa do HIV por competição com nucleosídeos de ocorrência natural, o que resulta na finalização da síntese do DNA viral. A sua utilização é eficaz na inibição de ambos os tipos de HIV (1 e 2). Outra aplicação é a utilização deste fármaco no tratamento de hepatite-B sendo administrada em menores concentrações¹⁻².

Principais efeitos colaterais

Quase não possui efeitos colaterais, mas em alguns casos pode ocasionar dores de cabeça e barriga, enjoos, vômitos e diarreia. Deve-se evitar o uso concomitante com a Zalcitabina¹

5.2 – Instrumentação

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos e software (HP ChemStation, ver A.08.03) para tratamento e aquisição de dados. O aparelho possui um sistema de refrigeração do capilar por circulação de ar forçado que possibilita o controle da temperatura interna do capilar.

Nos experimentos realizados foram feitos utilizando capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), revestidos externamente com poliimida, com 50 µm de diâmetro interno, 28,5 cm de comprimento total e 20 cm até o detector. As lavagens de condicionamento inicial do capilar, foram realizadas por pressão de aproximadamente 940 mbars, com passagem de hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹ por 30 minutos, seguidos de 30 minutos de água deionizada, 10 minutos de eletrólito de corrida. No intervalo entre as corridas o capilar foi recondicionado com lavagens de 5 minutos de eletrólito e no término das análises 5 minutos de hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹ e 5 minutos de água deionizada para a limpeza do capilar.

5.3 – Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico e a água deionizada purificada através de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Padrões dos fármacos lamivudina e fluoxetina, foram adquiridos da Farmanguinhos – FIOCRUZ, RJ. Soluções padrão estoque foram preparadas nas concentrações de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente e armazenadas sob refrigeração (4°C). Foram preparadas soluções estoque de dihidrogenio fosfato de sódio, TRIS na concentração de 100mmol.L^{-1} e trietilamina (TEA) a 1% (v/v). Os eletrólitos utilizados na metodologia desenvolvida foram preparados diariamente através das respectivas diluições das soluções estoque em água deionizada.

5.4 – Amostras

Vinte comprimidos de lamivudina (150 mg) de diferentes lotes (Amostra 1 e 2), fornecidos pela Farmanguinhos – FIOCRUZ, RJ, foram pesados em balança analítica e em seguida triturados com o auxílio de um almofariz e pistilo. Uma porção equivalente 20 mg do ativo foi pesada em balança analítica e em seguida transferida para um balão volumétrico de 100 mL. O material foi dissolvido adicionando 10 mL de acetonitrila e completando-se o volume com água deionizada. Após dissolução do material este foi filtrado utilizando-se membranas de 0,45 μm (Millipore). Uma alíquota de 5 mL desta solução e 1 mL de fluoxetina ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), foram transferidas para um balão de 10 mL e o volume completado com água deionizada. As concentrações finais foram de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a lamivudina e a fluoxetina, respectivamente.

5.5 – Desenvolvimento da metodologia

O caráter básico da lamivudina (Figura 5.1), permite que esta seja analisada por CE, onde sua carga e conseqüentemente sua mobilidade podem ser alteradas em função do pH. Em $\text{pH} \leq 2,5$ a molécula encontra-se ionizada positivamente (protonação do grupo amina), que permite sua migração até o detector, quando submetida à ação de um campo elétrico. Desta forma, a escolha de um bom sistema tamponante se torna necessária, para assegurar o controle do pH e conseqüentemente a carga adquirida pela molécula. Estudos preliminares foram feitos utilizando-se como eletrólito o dihidrogenofosfato de sódio ($10 - 20 \text{ mmol.L}^{-1}$), com $\text{pH} = 2,5$ ajustado com ácido fosfórico. Observou-se no eletroferograma da Figura 5.2 deformações no pico da lamivudina, referente provavelmente ao processo de adsorção do analito na parede do capilar. Uma forma de se minimizar este tipo de interação é a adição de compostos normalmente aminas, as quais interagem com a parede do capilar minimizando a adsorção do analito, um composto comumente utilizado é a trietilamina (TEA), a qual não absorve na região do UV/VIS e no pH utilizado encontra-se carregada positivamente. A concentração otimizada de TEA foi 0,5 % (v/v) em um eletrólito com $\text{pH} = 2,5$ ajustado com ácido fosfórico (Figura 5.3). Porém mesmo minimizando-se as interações do analito com a parede do capilar, observa-se uma cauda no pico formado, este fato deve-se à diferença de mobilidade do analito e do co-íon no eletrólito (fenômeno de eletrodispersão)³. A mobilidade do co-íon pode ser ajustada, adicionando-se normalmente uma espécie, que não interfira na análise e possua uma mobilidade próxima a do analito. Buscando-se um composto com estas características utilizou-se o software PeakMaster⁴ distribuído gratuitamente na Internet, onde através da consulta de seu banco de dados e

simulações, observou-se que o tris-hidroximetilaminometano (TRIS) poderia ser utilizado; sua concentração otimizada foi de 20 mmol.L⁻¹ (Figura 5.4).

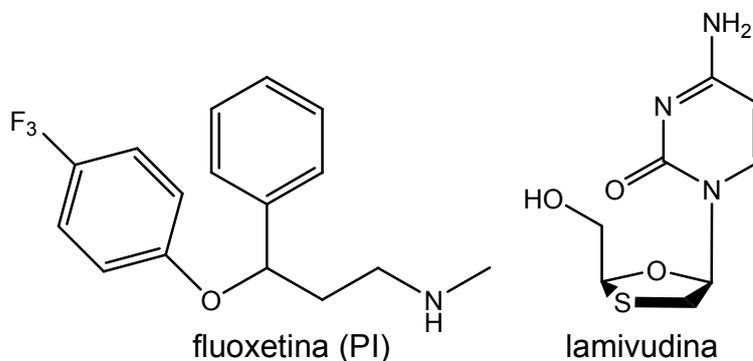


Figura 5.1 – Estrutura química do fármaco de estudo e o padrão interno utilizado

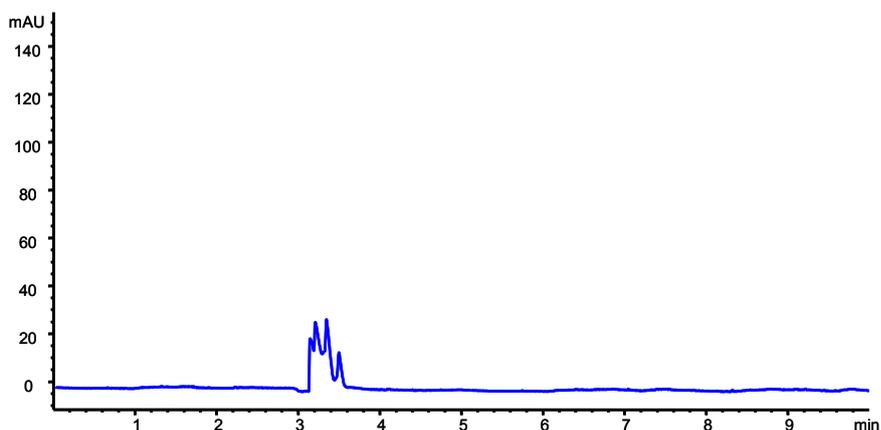


Figura 5.2 – Eletroferograma de uma solução padrão de lamivudina (100 µg.mL⁻¹), eletrólito 10 mmol.L⁻¹ tampão fosfato (pH = 2,5), injeção 5 s (50 mbar), 25 kV, λ = 200 nm.

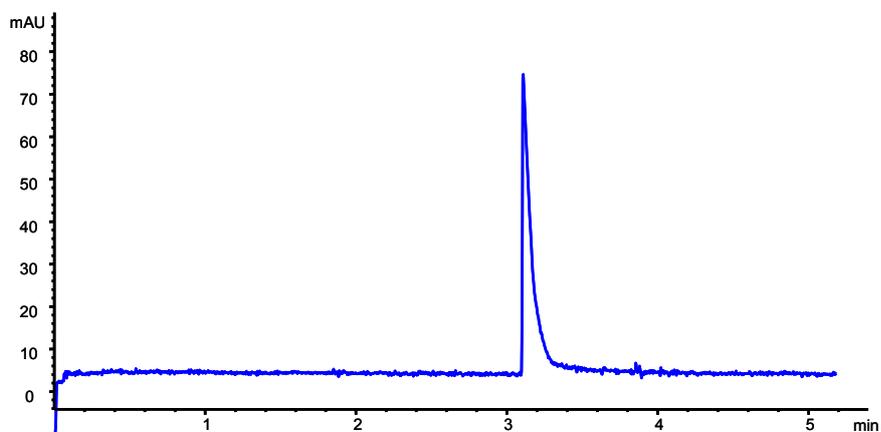


Figura 5.3 – Eletroferograma de uma solução padrão de lamivudina (100 µg.mL⁻¹), eletrólito 10 mmol.L⁻¹ tampão fosfato, 0,5 % TEA (pH = 2,5), tempo de injeção 5 s (50 mbar), 25 kV, λ = 200 nm.

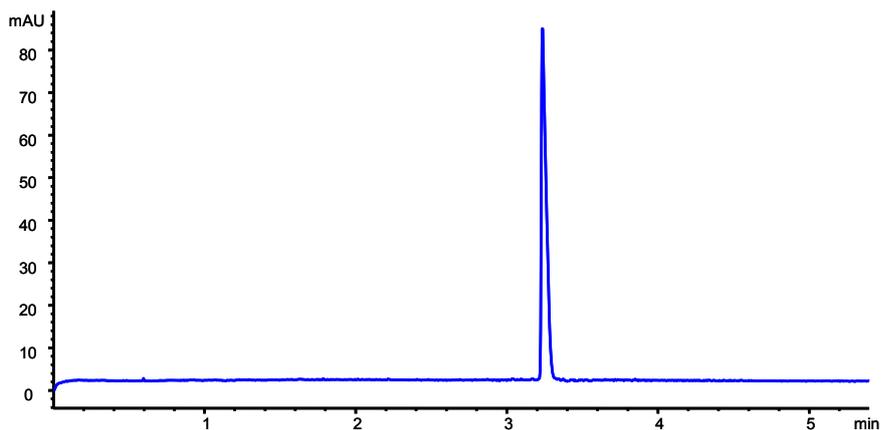


Figura 5.4 – Eletroferograma de uma mistura padrão de lamivudina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), eletrólito otimizado: 0,5 % TEA, 20 mmol.L^{-1} de TRIS, pH = 2,5 ajustado com ácido fosfórico, tempo de injeção 5 s (50 mbar), 25 kV, $\lambda = 200 \text{ nm}$.

Para a minimização de erros provenientes da injeção do equipamento, optou-se pelo uso de um padrão interno, o qual deve possuir características semelhantes ao analito (tempo de migração próximo, absorvidade). Dentre os diversos padrões de fármacos disponíveis, utilizou-se a fluoxetina como padrão interno (Figura 5.1), por tratar-se de um composto básico e ser possível de se analisar pela metodologia proposta (Figura 5.5).

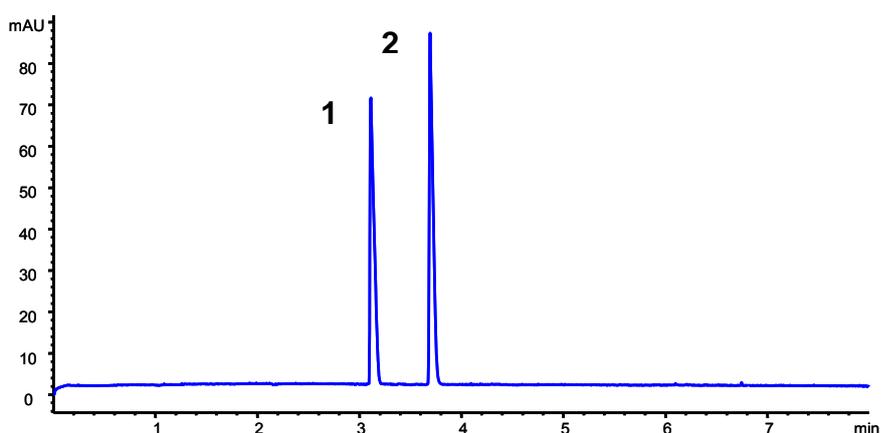


Figura 5.5 – Eletroferograma de uma mistura padrão de lamivudina (1) ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e fluoxetina (2) ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (PI), Eletrólito 0,5 % TEA, 20 mmol.L^{-1} de TRIS, pH = 2,5 ajustado com ácido fosfórico. Tempo de injeção 5 s (50 mbar), 25 kV, $\lambda = 200 \text{ nm}$.

5.6 – Validação do método desenvolvido

A metodologia proposta foi validada segundo os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão e recuperação, de acordo com os órgãos reguladores⁵⁻⁷.

5.6.1 – Linearidade, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Para a construção da curva analítica o padrão de lamivudina, foi injetado no intervalo de concentração entre 80 – 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contendo 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão interno. A curva analítica foi construída com base na razão das áreas dos picos (lamivudina / fluoxetina) versus a concentração, e posterior regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (Figura 5.6). A Tabela 5.1 mostra os parâmetros referentes a regressão linear. Observa-se que o método apresentou linearidade com $r > 0,999$ na faixa de concentração estudada. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para a lamivudina foram 1,81 e 5,56 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Os critérios utilizados para determinar o LOD e LOQ foram baseados nos parâmetros referentes a regressão linear, comumente indicado nos protocolos de validação de fármacos em medicamentos, muito embora esta prática não seja estritamente correta, uma vez que o LOQ está fora da curva analítica.

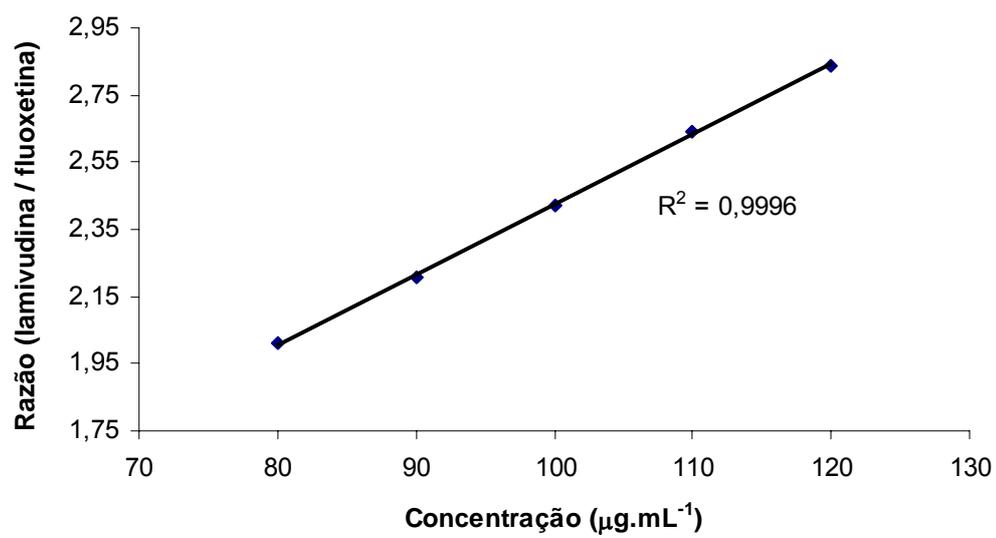


Figura 5.6 – Curva analítica da lamivudina.

Tabela 5.1 – Validação do método para lamivudina em relação a linearidade, limite de detecção e quantificação.

<i>Parâmetros</i>	<i>Dados estatísticos</i>
Faixa linear ^a ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	80 – 120
Coeficiente linear	-0,0317
Coeficiente angular (S)	0,00612
Coeficiente de correlação (r)	0,99955
Erro da regressão (s)	0,00337
Limite de detecção ^b ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1,81
Limite de quantificação ^c ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	5,56

^a cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível

^b LOD = 3,3(s/S)

^c LOQ = 10(s/S)

5.6.2 – Precisão do método – Repetibilidade

A precisão intra-ensaio foi determinada através da análise da amostras em três níveis de concentração (80, 100 e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com três determinações para cada nível. A repetibilidade foi demonstrada pelo coeficiente de variação (%CV) das razões das áreas (lamivudina/PI). Os dados estão apresentados na Tabela 5.2. Os valores relativos à precisão devem ser menores que 2,0 %⁸.

Tabela 5.2 – Precisão intra-ensio do método para lamivudina.

Concentração amostra ^a ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% CV
80,0	0,85
100,00	0,92
120,00	0,96
CV ^b (%)	0,91

^a Três determinações para cada nível

^b CV (nove determinações)

5.6.3 – Testes de recuperação

A exatidão do método foi calculada como a porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida de analito adicionada à amostra. Na Tabela 5.3 pode ser observado que os valores da recuperação variaram de 96,6 a 103,1 %.

Tabela 5.3 – Teste de recuperação de padrão de lamivudina adicionado a amostras comerciais analisadas pelo método proposto.

Amostra	Padrão adicionado	Padrão encontrado	Recuperação (%)
1 ^a	40	39,8	99,5
1 ^a	50	51,1	102,2
1 ^a	60	61,9	103,1
2 ^a	40	41,2	103,0
2 ^a	50	48,3	96,6
2 ^a	60	60,3	100,5

^a Amostras de diferentes lotes

5.6.4 – Aplicação do método em amostras

Para demonstrar a aplicabilidade da metodologia proposta, nas condições anteriormente descritas, amostras de comprimidos contendo lamivudina como princípio ativo foram analisadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.7 e na Tabela 5.4.

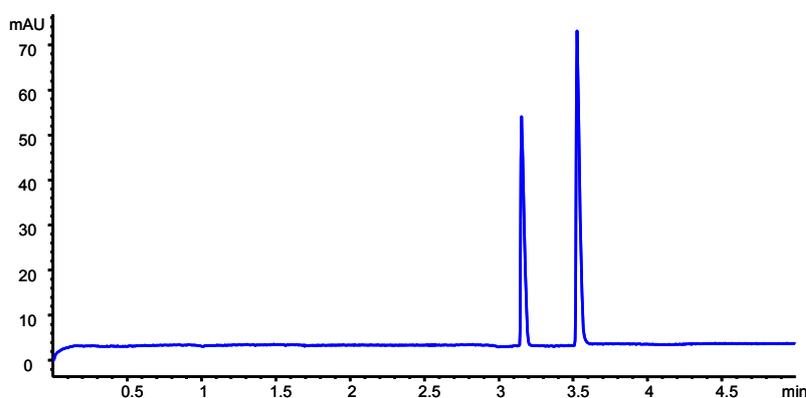


Figura 5.7 – Eletroferograma da amostra 2 de lamivudina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e fluoxetina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (PI), Eletrólito 0,5 % TEA, 20 mmol.L^{-1} de TRIS, pH = 2,5 ajustado com ácido fosfórico. Tempo de injeção 5 s (50 mbar), 25 kV, $\lambda = 200 \text{ nm}$.

Tabela 5.4 – Resultados das análises de lamivudina em formulações farmacêuticas.

Parâmetros	Amostra 1^a	Amostra 2^a
Quantidade declarada (mg/cápsula)	150,0	150,0
Quantidade encontrada (mg/cápsula)	152,2	147,9
CV (%)	1,1	1,6
Pureza (%)	101,4±0,22	98,6±0,31

^a Amostras de diferentes lotes

5.7 – Investigação de impurezas enantioméricas através da utilização de ciclodextrinas

Uma vez que a lamivudina é uma substância que pode possuir até 4 enantiômeros, sendo que uma dessas conformações possui atividade tóxica quando absorvida pelo organismo, buscou-se a determinação qualitativa de possíveis impurezas quirais presentes nas formulações disponíveis no laboratório.

Como as ciclodextrinas (CD) são os seletores quirais mais utilizados em eletroforese capilar, a investigação de possíveis impurezas quirais foi feita utilizando-se diferentes ciclodextrinas disponíveis no laboratório⁹. A estratégia inicial foi de se utilizar seletores quirais neutros no pH em estudo (pH=2,5), como a metil (M), dimetil (DM) e hidroxipropil (OH) – β – CD. Como o eletrólito de separação utilizado anteriormente era ácido, as CDs neste meio (ausência de fluxo eletrosmótico), tendem a ficar estáticas no interior do capilar, quando se aplica um determinado campo elétrico. Com a passagem do analito, estes formam complexos transitórios com as CDs, onde na presença de enantiômeros estes sofrem interações que levam a uma modificação na sua mobilidade, com possível resolução dos isômeros. As separações foram realizadas adicionando-se proporções de CDs que variam de 0 a 2,5 % (m/v), a seguir são apresentados os eletroferogramas obtidos utilizando-se ciclodextrinas a 2,5 % (m/v) (Figuras 5.8; 5.9; 5.10).

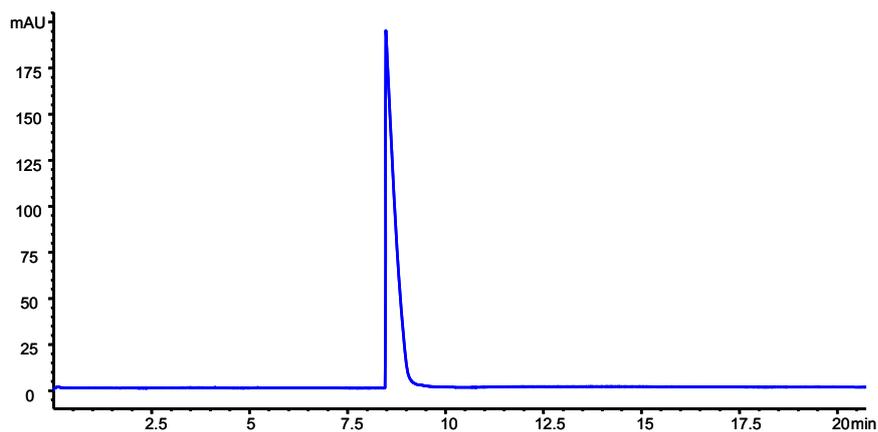


Figura 5.8 – Eletroferograma para amostra de matéria-prima de lamivudina ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Eletrólito de corrida: 0,5 % TEA, 20 mmol.L^{-1} de TRIS, pH = 2,5 ajustado com ácido fosfórico, 2,5 % M- β -CD. Tempo de injeção 5 s (50 mbar), 20 kV, $\lambda = 200 \text{ nm}$.

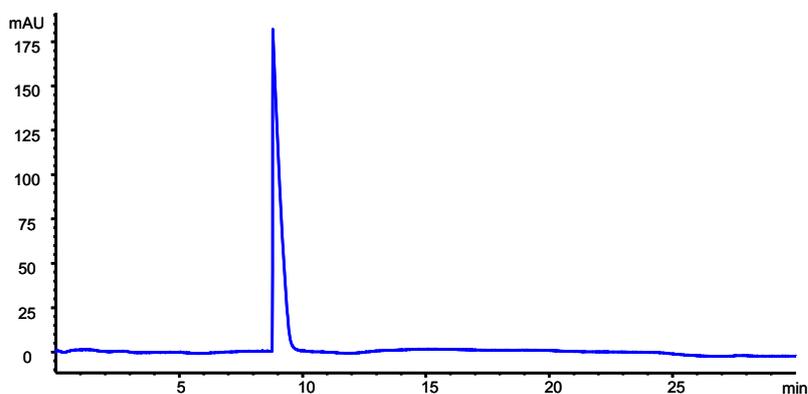


Figura 5.9 – Eletroferograma para amostra de matéria-prima de lamivudina ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Eletrólito de corrida: 0,5 % TEA, 20 mmol.L^{-1} de TRIS, pH = 2,5 ajustado com ácido fosfórico, 2,5 % DM- β -CD. Tempo de injeção 5 s (50 mbar), 20 kV, $\lambda = 200 \text{ nm}$.

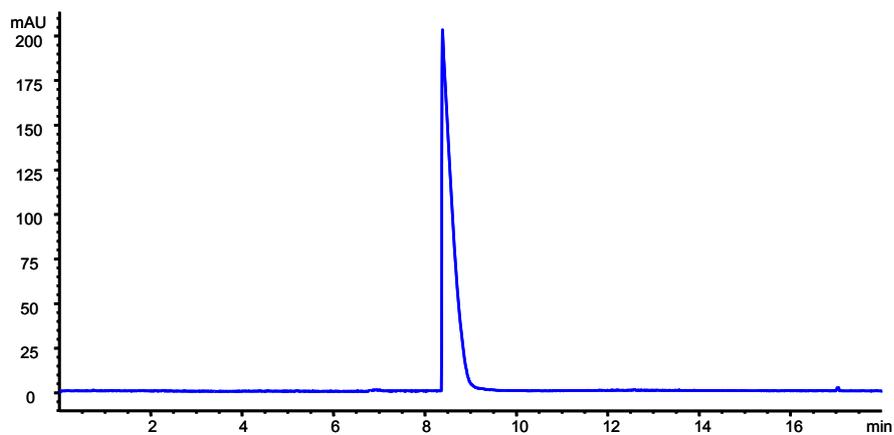


Figura 5.10 – Eletroferograma para amostra de matéria-prima de lamivudina ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Eletrólito de corrida: 0,5 % TEA, 20 mmol.L^{-1} de TRIS, pH = 2,5 ajustado com ácido fosfórico, 2,5 % OH- β -CD. Tempo de injeção 5 s (50 mbar), 20 kV, $\lambda = 200 \text{ nm}$.

Pode-se observar através dos eletroferogramas que para a solução padrão de lamivudina, as CDs influenciam o tempo de migração de compostos, ocasionada pela interação entre o analito e a ciclodextrina. Variando-se a concentração do seletor quiral, não observou-se a separação de nenhum enantiômero. Isso implica que possivelmente as amostras possuem um grau de pureza quiral elevado ou a CD não se mostrou adequada para discriminar os isômeros.

5.8 – Conclusões

Um método simples e preciso por CZE foi desenvolvido para a determinação de lamivudina em formulações farmacêuticas com um tempo de análise inferior a 3,5 minutos. A validação mostra que o método proposto possui características adequadas e pode ser facilmente implementado na rotina analítica de laboratórios de controle de qualidade.

5.9 – Referências

1. http://www.spcd.org.br/medicamentos_3tc.htm, acessada em Maio 2007.
2. Silva, G. R. da; Lages, G. P.; Pianetti, G. A.; Nunan, E. A.; Soares, C. D. V.; Campos, L. M. M. Determinação de lamivudina, estavudina e nevirapina, em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência. Química Nova, v.29, no.6, p.1159-1163. 2006.
3. Tavares, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. Química Nova, v.20, n.5, p.493 – 511. 1997.
4. Group of electromigration separation processes, <http://prfdec.natur.cuni.cz/~gas/> , acessada Maio 2007.
5. AOAC – Validated Methods, <http://www.aoac.org/> , acessada Maio 2007.
6. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, <http://www.anvisa.org.br/> , acessada Maio 2007.
7. ICH – International Conference of Harmonization, <http://www.ich.org/> , acessada Maio 2007.
8. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova. v.27, n.5, p.771 – 780. 2004.
9. BONATO, P. S.; JABOR, Valquíria A. Polisel; GAITANI, Cristiane Masetto de. Análise Enantiosseletiva de Fármacos: Contribuições da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Eletroforese Capilar. Química Nova, v.28, n.4, p.683 – 691, 2005.

CAPÍTULO 6
METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO
ESTAVUDINA, RITONAVIR E EFAVIRENZ EM
FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

6.1 – Introdução

O tratamento inicial para AIDS, consiste na utilização de fármacos responsáveis por atuarem em diferentes pontos do ciclo replicativo viral, sendo normalmente utilizados em combinações. A estavudina, ritonavir e o efavirenz, são fármacos recomendados para compor a terapia anti-retroviral¹.

A estavudina (2',3'-didesidro-desoxitimidina), possui atividade semelhante aos análogos nucleosídeos, onde sua ação ocorre através da fosforilação por enzimas quinases celulares, gerando metabólitos que inibem a transcriptase. O efavirenz (do inglês, 8-chloro-5-(2-cyclopropylethynyl)- 5-(trifluoromethyl)- 4-oxa-2-azabicyclo [4.4.0]deca- 7,9,11-trien-3-one) induz mudanças conformacionais no sítio ativo da enzima transcriptase reversa do HIV, impedindo sua ação. O ritonavir (do inglês, 1,3-thiazol-5-ylmethyl [3-hydroxy-5- [3-methyl-2-[methyl- [(2-propan-2-yl-1,3-thiazol- 4-yl)methyl] carbamoyl] amino-butanoyl] amino-1,6-diphenyl-hexan-2-yl] aminoformate) atua na enzima responsável pela metabolização dos inibidores da protease no fígado, acarretando em um aumento dos metabólitos ativos os quais irão atuar na inibição do vírus²⁻⁴.

Apesar dos avanços na abordagem clínica da infecção pelo HIV, através da administração de esquemas terapêuticos potentes, ainda constam falhas terapêuticas decorrentes de toxicidade do fármaco, resistência viral e principalmente falta de adesão ao tratamento. Um dos principais motivos que levam à diminuição da adesão ao tratamento, pelos pacientes é a complexidade do regime terapêutico, com a administração de um grande número de comprimidos e cápsulas diariamente. Com isso um grande interesse vem sendo demonstrado pelas indústrias farmacêuticas na utilização destes fármacos combinados em uma única cápsula⁵.

6.2 – Instrumentação

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos e software (HP ChemStation, ver A.08.03) para tratamento e aquisição de dados. O aparelho possui sistema de refrigeração do capilar por circulação de ar forçado que possibilita o controle da temperatura interna do capilar.

Os experimentos realizados no desenvolvimento deste método utilizando-se MEKC, foram feitos com capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), revestidos externamente com poliimida, com 75 µm de diâmetro interno, 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector. As lavagens de condicionamento inicial do capilar, foram realizadas por pressão de aproximadamente 940 mbars, com passagem de hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹ por 30 minutos, seguidos de 30 minutos de água deionizada e 10 minutos de eletrólito de corrida. No intervalo entre as corridas o capilar foi recondicionado com lavagens de 5 minutos de eletrólito e no término das análises 5 minutos de hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹ e 5 minutos de água deionizada para a limpeza do capilar.

6.3 – Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico e a água deionizada purificada através de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Padrões dos fármacos estavudina, ritonavir e efavirenz, foram fornecidos pela Farmanguinhos – FIOCRUZ e Fundação do Remédio Popular - FURP. Soluções padrão estoque foram preparadas em acetonitrila com concentração aproximada de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e armazenadas sob refrigeração (4°C). Foram preparadas soluções estoque de tetraborato de sódio (TBS), dodecilsulfato de sódio (SDS) (Merck, Rio de Janeiro, RJ) na concentração de 100mmol.L^{-1} . Os eletrólitos utilizados na metodologia desenvolvida foram preparados diariamente, por respectivas diluições das soluções estoque em água deionizada.

6.4 – Amostras

Vinte comprimidos de estavudina (30 e 40 mg) e efavirenz (200mg), fornecidos pela Farmanguinhos, foram pesados em balança analítica e em seguida triturados com o auxílio de um almofariz e pistilo.

Uma porção equivalente 20 mg do princípio ativo de cada amostra foi pesada em balança analítica e em seguida transferida para um balão volumétrico de 100 mL. O material foi dissolvido adicionando-se 10 mL de acetonitrila e completando-se o volume com água deionizada. Após dissolução do material, este foi filtrado utilizando-se membranas de 0,45 μm (Millipore). Alíquotas de 5 mL destas soluções e 1,0 mL de padrão interno zidovudina ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram transferidas em balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com água deionizada. As concentrações finais foram de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para estavudina e o seu padrão interno.

6.5 - Desenvolvimento da metodologia para determinação simultânea da estavudina, ritonavir e efavirenz em formulações farmacêuticas

Uma abordagem inicial foi de se realizar a separação dos compostos por CE devido à presença de grupamentos ionizáveis (Figura 6.1), o que poderia permitir a análise dos compostos. Porém estudos preliminares utilizando-se como variáveis: pH do eletrólito de corrida (fosfato, pH 7; tetraborato - TBS, pH 9,3); concentração do eletrólito de corrida (10 – 40 mmol.L⁻¹); adição de solventes orgânicos (metanol, etanol e acetonitrila) nas concentrações (0 – 20 %) não atingiram a separação. Alguns parâmetros instrumentais como tensão aplicada (15 – 30 kV) e temperatura (20 – 30 °C), também foram estudados, entretanto, a separação não foi alcançada em nenhum dos experimentos realizados, onde em alguns casos o tempo de migração dos compostos era muito longo (ritonavir e efavirenz) ou a mobilidade do analito era muito próxima à mobilidade do fluxo eletrosmótico (estavudina).

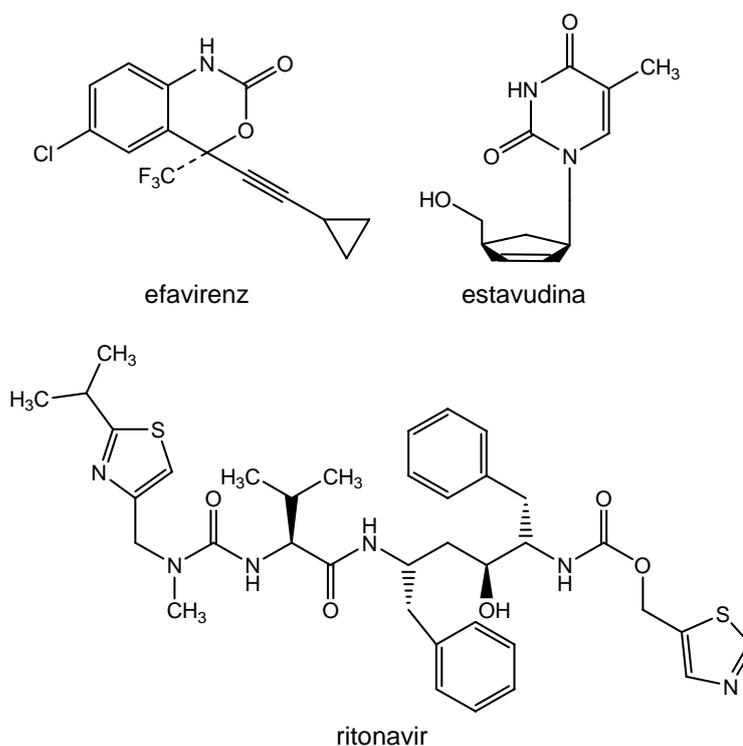


Figura 6.1 – Estrutura química do efavirenz, estavudina e ritonavir.

Com isso uma outra estratégia no desenvolvimento do método analítico foi a utilização da técnica da cromatografia eletrocínica micelar (MEKC), utilizando como tensoativo aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS) e como eletrólito TBS. Alguns experimentos foram realizados, mostrando que a adição de SDS ao eletrólito de separação proporciona uma diferenciação na mobilidade da estavudina não possível anteriormente em CE, porém, somente a adição de SDS ao meio não proporcionou uma análise com tempo migração e resolução adequadas entre os compostos. Uma das opções mais utilizadas em MEKC para melhoria da resolução e ajuste do fator de retenção dos compostos (k) é a utilização de solventes orgânicos (metanol, etanol e acetonitrila), entre outros, os quais proporcionam uma melhoria nestes fatores.

A fim de se otimizar a composição do eletrólito (TBS), concentração do tensoativo (SDS) e porcentagem do solvente utilizado acetonitrila (ACN), realizou um planejamento fatorial 2^{3+1} com ponto central (PC), escolhendo-se como fator de resposta, funções baseadas em resolução. As condições utilizadas na realização dos experimentos do planejamento foram: injeção hidrodinâmica durante 5 s (50 mbar), temperatura do capilar de 25°C, $\lambda = 200$ nm e tensão de 17,5 kV. As variáveis e níveis utilizados durante o planejamento fatorial estão descritos na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 – Variáveis e níveis do planejamento fatorial 2^{3+1} .

<i>Fatores</i>		<i>(-1)</i>	<i>(0)</i>	<i>(+1)</i>
1	TBS (mM)	10	15	20
2	SDS (mM)	20	25	30
3	ACN (%)	20	25	30

A Tabela 6.2 mostra os 11 ensaios executados. Os números de 1 a 11 na vertical a esquerda representam os ensaios e os números na vertical a direita a ordem pela qual foram realizados os experimentos. A ordem de execução foi escolhida aleatoriamente mediante sorteio. Os números de 1 a 3 na horizontal representam os fatores investigados (segundo Tabela 6.1).

Tabela 6.2 – Tabela com o planejamento fatorial 2^{3+1} para análise dos antiretrovirais com triplicata no ponto central.

<i>Ensaio</i>	1	2	3	<i>Ordem Aleatória</i>
1	-	-	-	11
2	+	-	-	6
3	-	+	-	9
4	+	+	-	10
5	-	-	+	2
6	+	-	+	4
7	-	+	+	8
8	+	+	+	1
9, 10, 11	0	0	0	7

Para se realizar uma avaliação dos eletroferogramas obtidos através do planejamento fatorial, como função resposta utilizou-se o CRS (*chromatographic resolution statistic*)⁶, que é definida pela expressão:

$$CRS = \left\{ \sum_{i=1}^{np} \left\{ \frac{R_{i,i+1} - R_{opt}}{R_{i,i+1} - R_{min}} \right\} \frac{1}{R_{i,i+1}} + \sum_{i=1}^{np} \frac{R_{i,i+1}^2}{npR_m^2} \right\} \frac{t_f}{n} \quad (6.2)$$

Onde $R^{i,i+1}$ é:

$$R_{i,i+1} = \frac{2(t_{i+1} - t_i)}{w_{bi} + w_{bi+1}} \quad (6.1)$$

A resolução $R_{i,i+1}$ entre as bandas de dois solutos adjacentes é definida pela diferença entre o tempo de migração t_i , dividida pelo valor médio entre as larguras de base de cada banda w_b , expressas nas mesmas unidades dos tempos de migração⁷.

Onde, R_m é a resolução média de todos os pares de soluto, R_{opt} a resolução ótima desejada, R_{min} a resolução mínima aceitável, t_f o tempo de migração do último soluto e n o número de solutos na amostra. O primeiro termo da CRS é a medida da separação entre picos adjacentes e se aproxima de zero quando todos os picos se aproximam de um valor de resolução definido como ótimo. O segundo termo da CRS mede a uniformidade do espaçamento entre os picos e este termo aproxima-se ao valor unitário, da resolução dos pares de picos individuais é igual ao valor médio das resoluções. Eletroferogramas com picos bem resolvidos e uniformemente espaçados minimizam o valor de CRS.

A seguir são apresentados os eletroferogramas correspondentes aos experimentos do planejamento fatorial realizado. Todos os compostos foram injetados na concentração de 100 mg.L⁻¹.

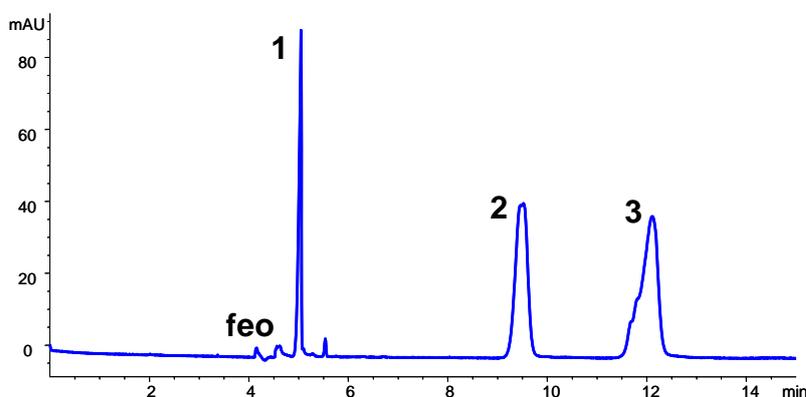


Figura 6.2 – Eletrólito 1(-,-,-). Separação de mistura padrão: 1 – estavudina; 2 – ritonavir; 3 – efavirenz.

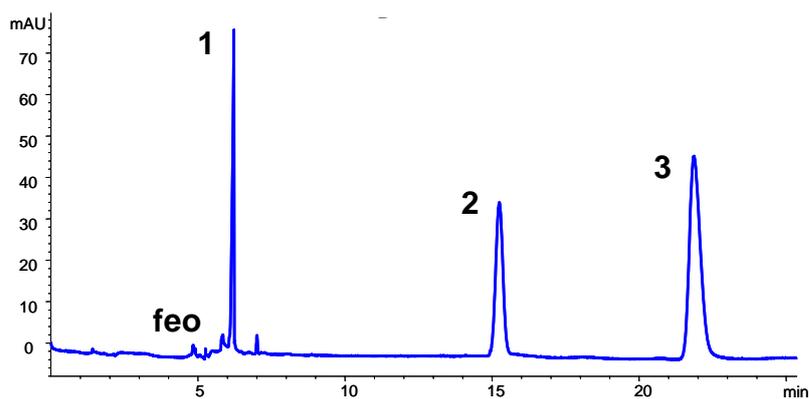


Figura 6.3 – Eletrólito 2 (+,-,-) Separação de mistura padrão: 1 – estavudina; 2 – ritonavir; 3 – efavirenz.

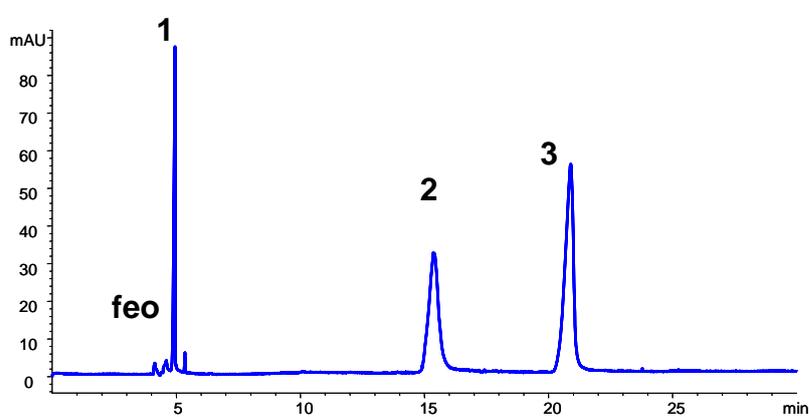


Figura 6.4 – Eletrólito 3 (-,+,-) Separação de mistura padrão: 1 – estavudina; 2 – ritonavir; 3 – efavirenz.

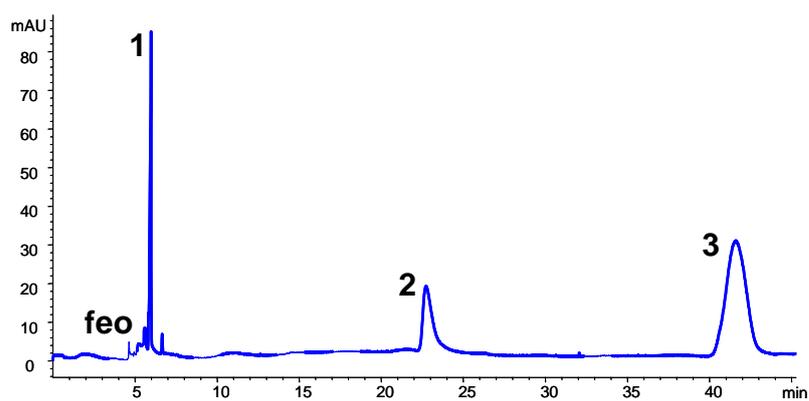


Figura 6.5 – Eletrólito 4 (+,+,-) Separação de mistura padrão: 1 – estavudina; 2 – ritonavir; 3 – efavirenz.

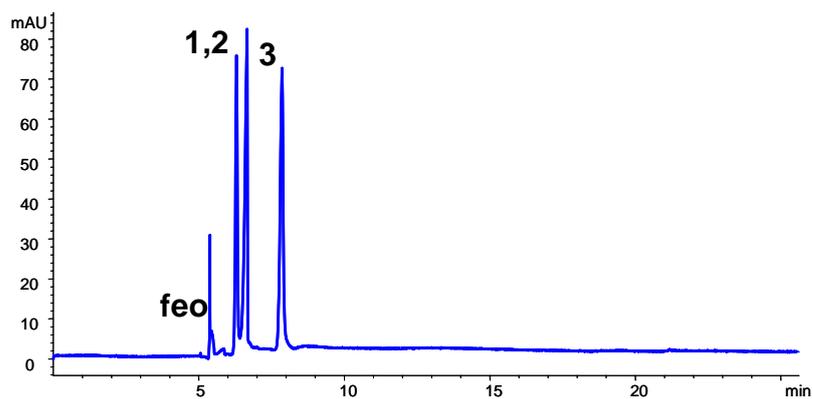


Figura 6.6 – Eletrólito 5 (-,-,+) Separação de mistura padrão: 1 – estavudina; 2 – ritonavir; 3 – efavirenz.

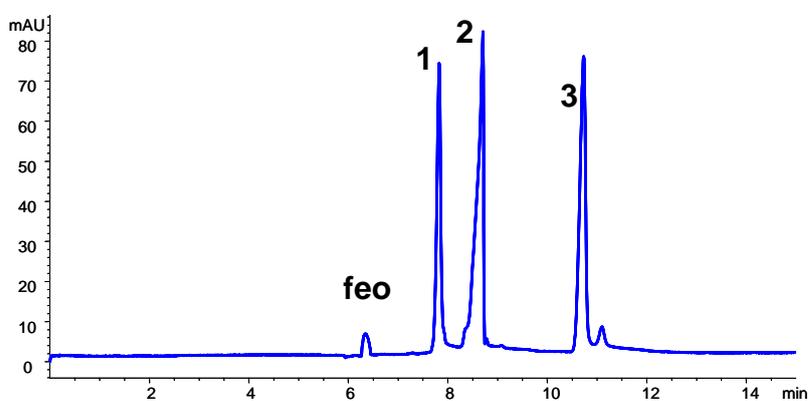


Figura 6.7 – Eletrólito 6 (+,-,+) Separação de mistura padrão: 1 – estavudina; 2 – ritonavir; 3 – efavirenz.

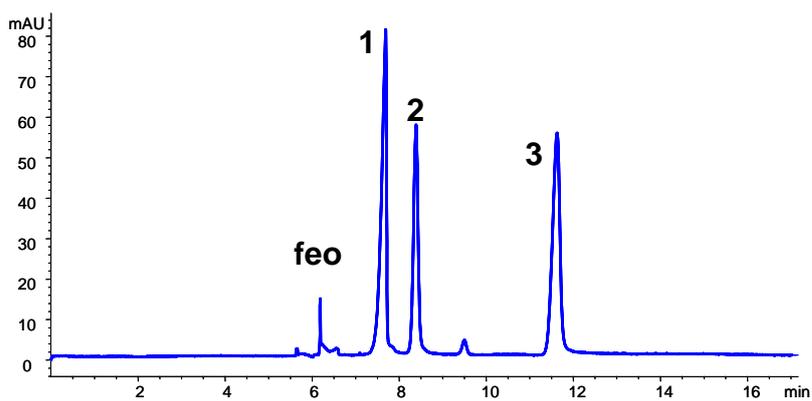


Figura 6.8 – Eletrólito 7 (-,+,+). Separação de mistura padrão: 1 – estavudina; 2 – ritonavir; 3 – efavirenz.

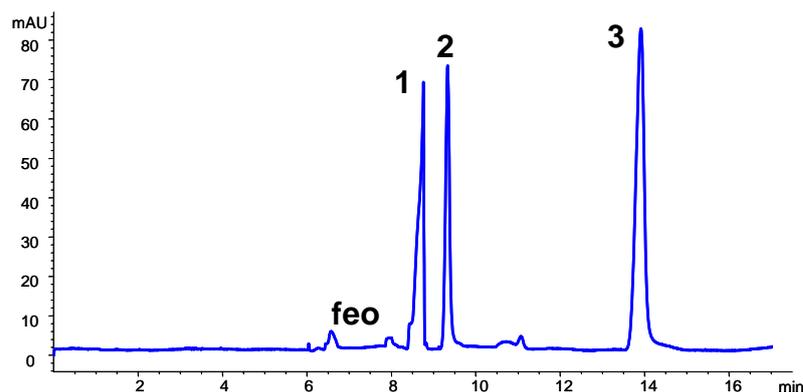


Figura 6.9 – Eletrólito 8 (+,+,+). Separação de mistura padrão: 1 – estavudina; 2 – ritonavir; 3 – efavirenz.

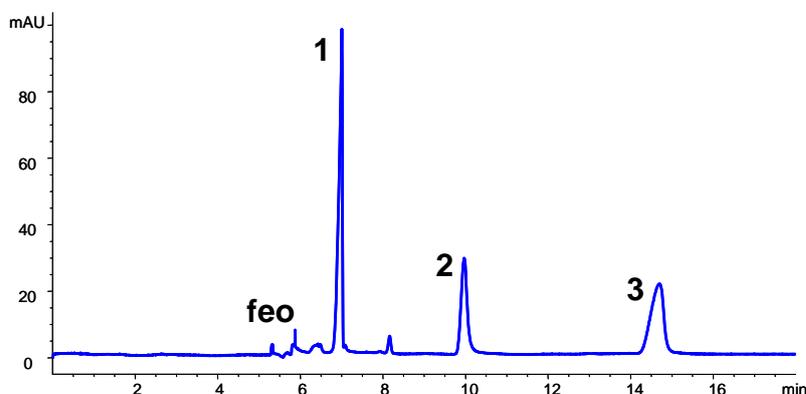


Figura 6.10 – Eletrólito 9 (0,0,0) - PC. Separação de mistura padrão: 1 – estavudina; 2 – ritonavir; 3 – efavirenz.

A comparação dos eletroferogramas obtidos com os eletrólitos 1 e 2, indicam que o aumento na concentração do TBS, causa um aumento considerável no tempo de migração dos compostos, com uma migração muito próxima do composto 1 ao fluxo eletrosmótico. Quando ocorre o aumento na concentração de SDS e aumento na concentração de TBS (eletroferograma 1), há mudanças significativas no espaçamento dos picos, com aumento exagerado no tempo de migração total. Porém quando se aumenta a concentração de solvente no eletrólito de corrida (Eletrólitos 5 e 6), juntamente com o aumento na concentração de TBS, se tem uma diminuição muito pronunciada na janela de migração (Eletrólito 5), conseqüentemente menor tempo de análise, e uma diferenciação entre a mobilidade

do fluxo eletrosmótico, e a migração dos compostos (eletrólito 6). Nos eletrólitos 7 e 8 observa-se que o aumento nas concentrações de SDS e % ACN influenciam o tempo de análise e no tempo de migração.

Tabela 6.3– Valores das funções resposta CRS para os experimentos do fatorial 2^3 com ponto central

<i>Ensaio</i>	1	2	3	<i>CRS</i>
1	-	-	-	7,0
2	+	-	-	34
3	-	+	-	18
4	+	+	-	63
5	-	-	+	3,5
6	+	-	+	3,7
7	-	+	+	5,3
8	+	+	+	8,4
9, 10, 11	0	0	0	5,7

Através do tratamento estatístico, da função resposta (Tabela 6.3), observa-se nitidamente que dois eletrólitos, poderiam ser utilizados (Ensaio 5 e 6), porém o eletrólito 5, existe uma proximidade muito grande do analito 1 (estavudina) do fluxo eletrosmótico, além da baixa resolução dos analitos 1 e 2. Portanto, as condições estabelecidas como ótimas na separação dos três fármacos, determinadas a partir da análise estatística dos efeitos individuais, juntamente com a análise das funções resposta provenientes do planejamento fatorial foram: 20 mmol.L⁻¹ de tetraborato de sódio (pH = 9,3), 20 mmol.L⁻¹ de SDS e 30 % de acetonitrila, tensão aplicada de 20 kV (polaridade positiva, ligeiramente aumentada para diminuir tempo de análise), comprimento do capilar, 48,5 cm, comprimento efetivo, 40 cm, 75 µm de diâmetro interno, janela de detecção, 3 mm e temperatura constante de 25°C. A fim de se melhorar a precisão da metodologia, minimizando possíveis erros de injeção do equipamento, escolheu-se dentro dos diversos

antiretrovirais disponíveis no laboratório a zidovudina como padrão interno (Figura 6.11).

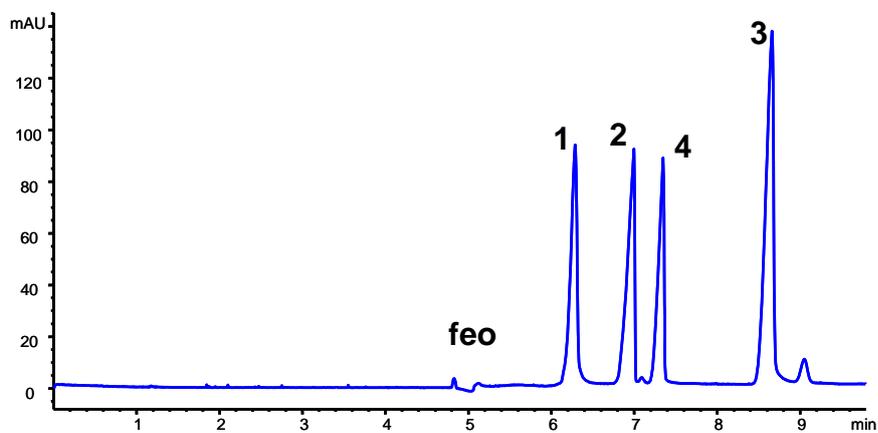


Figura 6.11 – Condição otimizada através do planejamento fatorial. Eletrólito: 20 mmol.L⁻¹ de tetraborato de sódio, 20 mmol⁻¹ de SDS e 30 % de acetonitrila. Separação de uma mistura padrões: 1 – estavudina; 2 – ritonavir; 3 – efavirenz; 4 - zidovudina.

6.6 – Validação do método desenvolvido para estavudina

A metodologia proposta foi validada segundo os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão e recuperação.

6.6.1 – Linearidade, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Para a construção da curva analítica soluções padrão de estavudina, foram injetadas no intervalo de concentração entre 80 – 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contendo 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão interno. A curva analítica foi construída com base na razão das áreas dos picos (estavudina / zidovudina) versus a concentração, e posterior regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (Figura 6.12). A Tabela 6.4 refere-se aos parâmetros referentes a regressão linear. Observa-se que o método boa apresentou linearidade com $r > 0,999$ na faixa de concentração estudada. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para a estavudina foram 2,4 e 7,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Os critérios utilizados para determinar o LOD e LOQ foram baseados nos parâmetros referentes à regressão linear.

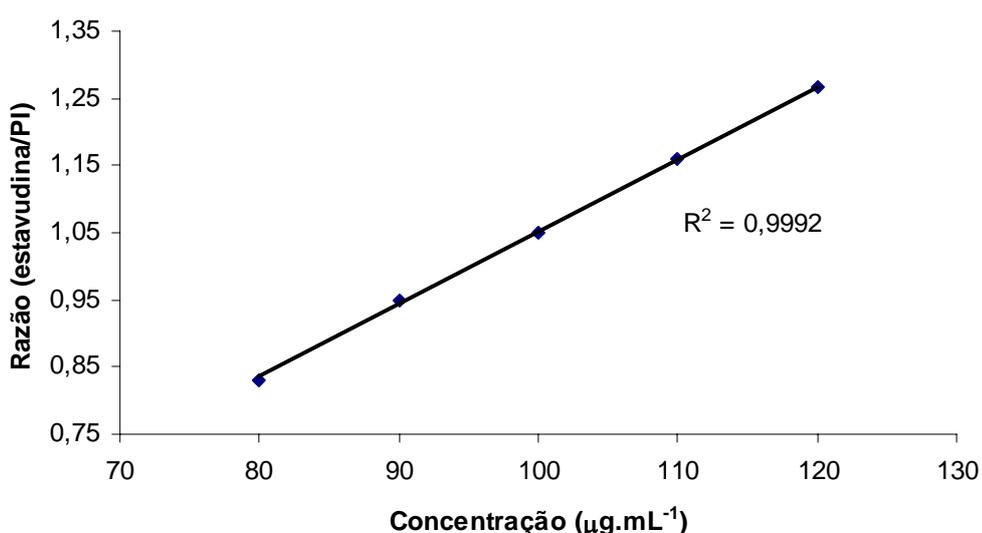


Figura 6.12 – Curva analítica estavudina.

Tabela 6.4 – Validação do método para a estavudina em relação a linearidade, limite de detecção e quantificação.

<i>Parâmetros</i>	<i>Dados estatísticos</i>
Faixa linear ^a ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	80 – 120
Coeficiente linear	-0,038
Coeficiente angular (S)	0,01087
Coeficiente de correlação (r)	0,9992
Erro da regressão (s)	0,00796
Limite de detecção ^b ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2,4
Limite de quantificação ^c ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	7,3

^a cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível

^b LOD = 3,3(s/S)

^c LOQ = 10(s/S)

6.6.2 – Precisão do método – intra-ensaio

A precisão foi determinada através da análise das amostras em três níveis de concentração (80, 100 e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com três determinações para cada nível. A precisão foi demonstrada pelo coeficiente de variação (%CV) das razões das áreas (estavudina / zidovudina - PI). Os dados são apresentados na Tabela 6.5. Para assegurar uma boa precisão do método esperam-se os valores de % CV menores que 2,0 %⁸.

Tabela 6.5 – Precisão do método - Repetitividade

Concentração amostra ^a ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% CV
80,0	0,95
100,00	1,1
120,00	0,99
CV ^b (%)	1,0

^a Três determinações para cada nível

^b CV (nove determinações)

6.6.3 – Testes de recuperação

A exatidão do método foi calculada como a porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida de analito adicionada à amostra. Na Tabela 6.6 pode ser observado que os valores da recuperação média obtidos para a estavudina compreendem a faixa de 97,0 a 102,2 %.

Tabela 6.6 – Teste de recuperação de padrão de estavudina adicionado a uma amostra comercial e analisadas pelo método proposto.

Amostra	Amostra comercial adicionada	Padrão adicionado	Padrão encontrado	Recuperação (%)
1 ^a	40	40	39,5	98,8
1 ^a	50	50	51,1	102,2
1 ^a	60	60	58,2	97,0
2 ^a	40	40	40,3	100,8
2 ^a	50	50	49,2	98,4
2 ^a	60	60	58,9	98,1

^a amostras de estavudina de diferentes lotes

6.6.4 – Aplicação do método em amostras

Para demonstrar a aplicabilidade da metodologia proposta, nas condições anteriormente descritas, amostras contendo estavudina como princípio ativo foram analisadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6.13 e na Tabela 6.7.

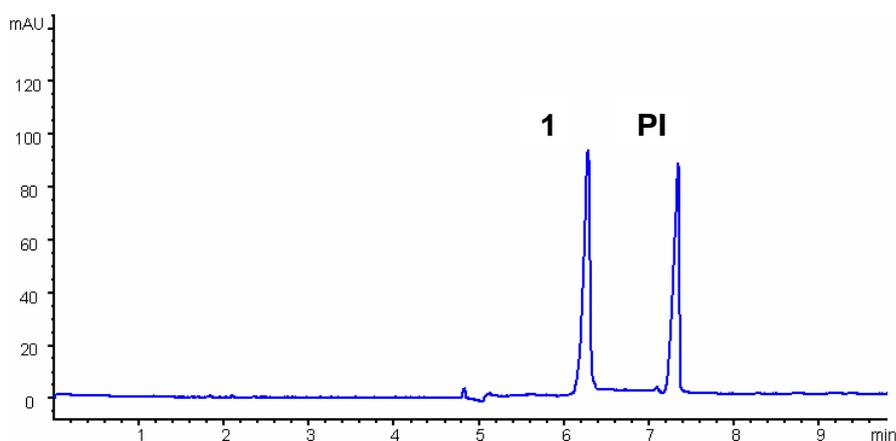


Figura 6.15– Eletroferograma da amostra 1 de estavudina (1) e zidovudina (PI) ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Eletrólito: 20 mmol.L^{-1} de tetraborato de sódio, 20 mmol.L^{-1} de SDS, 30 % de acetonitrila. Injeção 5 s (50 mbar), 20 kV , $\lambda = 200 \text{ nm}$.

Tabela 6.7 – Resultados das análises das amostras de estavudina (30 e 40 mg)

Parâmetros	Amostra 1	Amostra 2
Quantidade declarada (mg/cápsula)	30	40
Quantidade encontrada (mg/cápsula)	29,8	40,5
CV (%)	1,12	0,87
Pureza (%)	99,3±0,15	101,3±0,33

6.7 – Validação do método desenvolvido para efavirenz

6.7.1 – Linearidade, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Para a construção da curva analítica soluções padrão de efavirenz, foram injetados no intervalo de concentração entre 80 – 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contendo 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão interno. A curva analítica foi construída com base na razão das áreas dos picos (efavirenz / zidovudina) versus a concentração, e posterior regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (Figura 6.14). A Tabela 6.8 compila os parâmetros referentes a regressão linear. Observa-se que o método apresentou linearidade com $r > 0,9987$ na faixa de concentração estudada. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para a estavudina foram 1,6 e 4,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Os critérios utilizados para determinar o LOD e LOQ foram baseados nos parâmetros referentes a regressão linear.

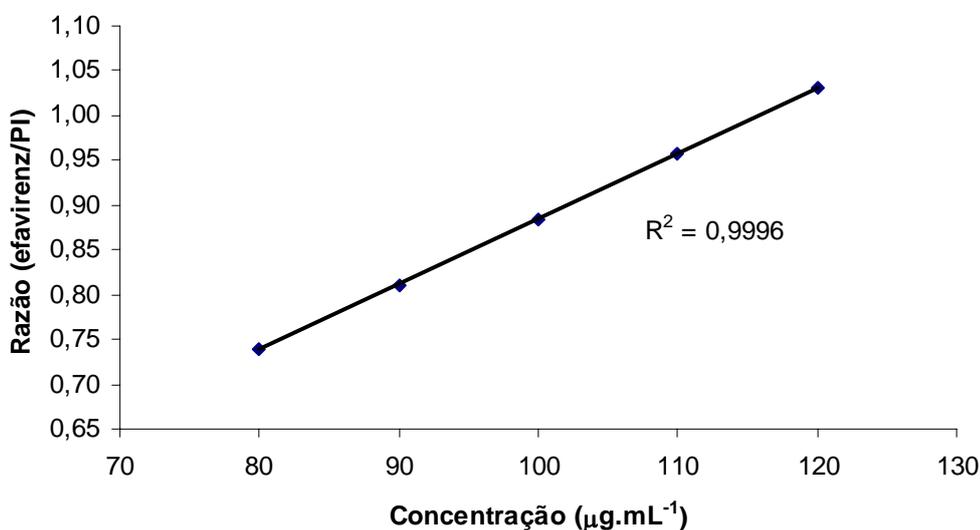


Figura 6.14 – Curva analítica para o efavirenz, faixa 80 à 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 6.8 – Validação do método em relação a linearidade, limite de detecção e quantificação

<i>Parâmetros</i>	<i>Dados estatísticos</i>
Faixa linear ^a ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	60 – 120
Coeficiente linear	0,1533
Coeficiente angular (S)	0,04753
Coeficiente de correlação (r)	0,9996
Erro da regressão (s)	0,04185
Limite de detecção ^b ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	2,9
Limite de quantificação ^c ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	8,8

^a cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível

^b LOD = 3,3(s/S)

^c LOQ = 10(s/S)

6.7.2 – Precisão do método

A precisão intra-ensaio foi determinada através da análise das amostras em três níveis de concentração (80, 100 e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com três determinações para cada nível. A precisão foi demonstrada pelo coeficiente de variação (%CV) das razões das áreas (Efavirenz/Zidovudina - PI). Dados apresentados na Tabela 6.9. O valores relativos a precisão devem ser menores que 2,0 %.

Tabela 6.9 – Precisão do método - Repetibilidade

Concentração amostra ^a ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% CV
80,0	1,2
100,00	0,9
240,00	1,7
CV ^b (%)	1,3

^a Três determinações para cada nível

^b CV (média das nove determinações)

6.7.3 – Testes de recuperação

A exatidão do método foi calculada como a porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida de analito adicionada à amostra. Na Tabela 6.10 pode ser observado que os valores da recuperação média obtidos para o efavirenz foram de 100,3 a 100,7 %.

Tabela 6.10 – Teste de recuperação de padrão de efavirenz adicionado a uma amostra comercial e analisadas pelo método proposto.

Amostra	Padrão adicionado	Padrão encontrado	Recuperação (%)
1 ^a	40	40,3	100,6
1 ^a	50	50,1	100,3
1 ^a	60	58,2	100,7

6.7.4 – Aplicação do método em amostras

Para demonstrar a aplicabilidade da metodologia proposta, nas condições anteriormente descritas, amostras contendo efavirenz como princípio ativo foram analisadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6.15 e na Tabela 6.11.

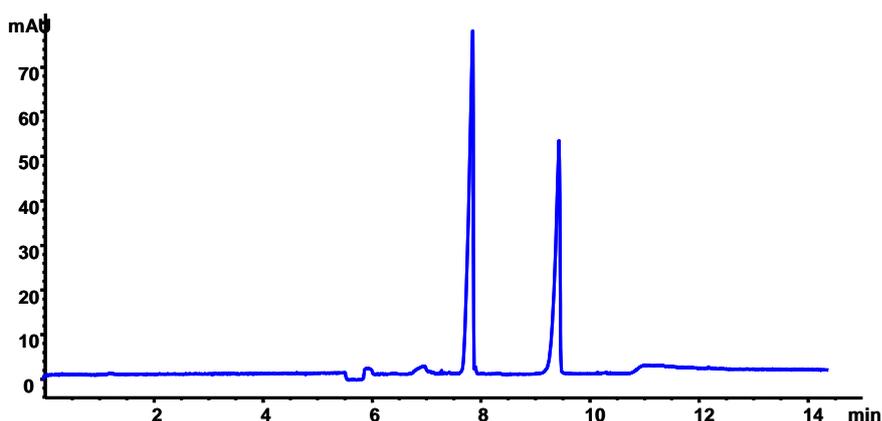


Figura 6.15– Eletroferograma da amostra de efavirenz e zidovudina (PI) ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Eletrólito: 20 mmol.L⁻¹ de tetraborato de sódio, 20 mmol.L⁻¹ de SDS, 30 % de acetonitrila. Injeção 5 s (50 mbar), 20 kV, $\lambda = 200 \text{ nm}$.

Tabela 6.11 – Resultados das análises de efavirenz em formulações farmacêuticas

Parâmetros	Amostra
Quantidade declarada (mg/cápsula)	200
Quantidade encontrada (mg/cápsula)	203,3
CV (%)	1,0
Pureza (%)	101,7 ± 0,45

6.8 Conclusões

Neste capítulo pode se observar como ferramentas quimiométricas podem auxiliar no desenvolvimento de métodos analíticos, gerando um número reduzido de experimentos e maximizando a separação entre os analitos com o menor tempo de análise. A metodologia proposta pode ser facilmente empregada na análise de formulações farmacêuticas individuais ou combinada.

6.9 – Referências

1. Coordenação Nacional de DST e AIDS, <http://www.aids.gov.br/> , acessada em Maio 2007.
2. MedScape. <http://www.medscape.com/viewarticle/417419>, acessada em Maio 2007
3. Merck & Co. Inc.; *The Merck Index*, 13nd ed., WhiteHouse Station: New Jersey, 2001.
4. <http://www.spcd.org.br/> , acessada em Maio de 2007.
5. Roca, B.; Gómez, C. J.; Arnedo, A.; Adherence, Side Effects and Efficacy of Stavudine plus Lamivudine plus Nelfinavir in Treatment-experienced HIV-infected Patients. Journal of Infection, v.41, p.50-54.2000.
6. Schlabach, T.D., Excoffier, J. L.; Multi-variate ranking function for optimizing separations. Journal of Chromatography, v.439, p.173-180.1988.
7. Camillieri, O.; *Capillary electrophoresis: Theory and Practice* Ed. New Directions in Organic and Biological Systems, CRC Press, Boca Raton, FL (1993).
8. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v.27, p.771 – 780. 2004.

CAPÍTULO 7
**METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE LAMIVUDINA,
NEVIRAPINA, INDINAVIR E ZALCITABINA EM AMOSTRAS
DE URINA**

7.1 – Introdução

A separação e determinação de antiretrovirais em matrizes biológicas são necessárias para os estudos farmacocinéticos¹ e também no monitoramento do tratamento, levando ao diagnóstico de possíveis resistências ao tratamento ou ineficácia do mesmo²

Diversos métodos utilizando CE para quantificação em amostra de soro, encontram-se disponíveis na literatura. Devido a baixa concentração esperada, técnicas de pré-concentração utilizando cartuchos de SPE são frequentemente utilizadas³⁻⁶. Uma nova abordagem que vem sendo adotada é a utilização da técnica acoplada à espectrometria de massas⁷⁻⁸. Cahours e colaboradores realizaram a determinação da didanosina e alguns nucleosídeos, atingindo a separação utilizando um eletrólito constituído de uma mistura de ácido fórmico e amônia (força iônica de 10 mmol.L⁻¹) e líquido auxiliar constituído de 0,5 % de ácido fórmico em MeOH:Água (1:1), atingindo um limite de detecção de 2 µg.L⁻¹⁸.

7.2 – Instrumentação

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (PACE/MQD, Beckman Coulter), acoplado a um espectrômetro de massas (LCQDeca XP Max, Finningan) do tipo íon trap e software (Xcalibur) para tratamento e aquisição de dados.

Os experimentos realizados no desenvolvimento deste método foram feitos utilizando capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), revestidos externamente com poliimida, com 50 μm de diâmetro interno, 80 cm aproximadamente de comprimento total. As lavagens de condicionamento inicial do capilar, foram realizadas por pressão de aproximadamente 20 psi, com passagem de hidróxido de sódio 1 mol.L^{-1} por 30 minutos, seguidos de 30 minutos de água deionizada. No intervalo entre as corridas o capilar foi recondicionado com lavagens de 5 minutos de eletrólito e no término das análises 5 minutos de hidróxido de amônio 1 mol.L^{-1} e 5 minutos de água deionizada para a limpeza do capilar.

7.3 – Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico e a água deionizada purificada através de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Padrões dos fármacos lamivudina, nevirapina, indinavir e zalcitabina, foram fornecidos pela FURP e Farmanguinhos - FIOCRUZ. Soluções padrão estoque foram preparadas em acetonitrila com concentração aproximada de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e armazenadas sob refrigeração (4°C). Foi preparada uma solução estoque de ácido fórmico 1 mol.L^{-1} . O eletrólito utilizado na metodologia desenvolvida foi preparado através das respectivas diluições das soluções estoque em água deionizada.

7.4 – Amostras

As amostras de urina foram preparadas através de fortificação com uma mistura de padrões, levadas a vortex durante 1 minuto e diluídas com adição de acetonitrila na proporção 2:1 (acetonitrila:amostra), sendo centrifugadas sob uma rotação de 10.000 rpm durante 5 minutos.

7.5 - Desenvolvimento da metodologia para análise do lamivudina, nevirapina, indinavir e zalcitabina.

O caráter básico destes fármacos (Figura 7.1), permite que estes sejam analisados por CZE, onde sua carga e conseqüentemente sua mobilidade podem ser alteradas em função do pH. Em $\text{pH} \leq 2,5$ estas moléculas encontram-se protonadas, que permite sua migração até o detector, quando submetida a ação de um campo elétrico. Uma vez que as moléculas separadas precisam ser levadas até o sistema de detecção (espectrômetro de massas), a escolha do eletrólito deve ser feita levando-se em consideração que o mesmo seja volátil e que não interfira na separação e muito menos na ionização dos compostos pelo electrospray. Experimentos iniciais foram feitos utilizando ácido acético e ácido fórmico como eletrólitos, porém somente com o último se obteve uma boa ionização. A concentração foi ajustada afim de se obter uma força iônica satisfatória para que ocorresse a separação sem deformações nos picos, com isso a concentração de ácido fórmico utilizada foi de 400 mmol.L^{-1} . O líquido auxiliar utilizado na formação do electrospray foi ajustado para uma concentração de 0,5 % de ácido fórmico (v/v) diluído em uma solução MeOH:H₂O (1:1). Os parâmetros referentes ao espectrômetro de massas foram otimizados através do software Xcalibur (Finningan), que permite a regulagem de todos os parâmetros internos do detector a fim de se obter a máxima sensibilidade do equipamento. A tensão do spray utilizada foi de 5 kV (ionização positiva), temperatura do capilar de entrada no MS em 250°C, fluxo de N₂ em 20 u.a.

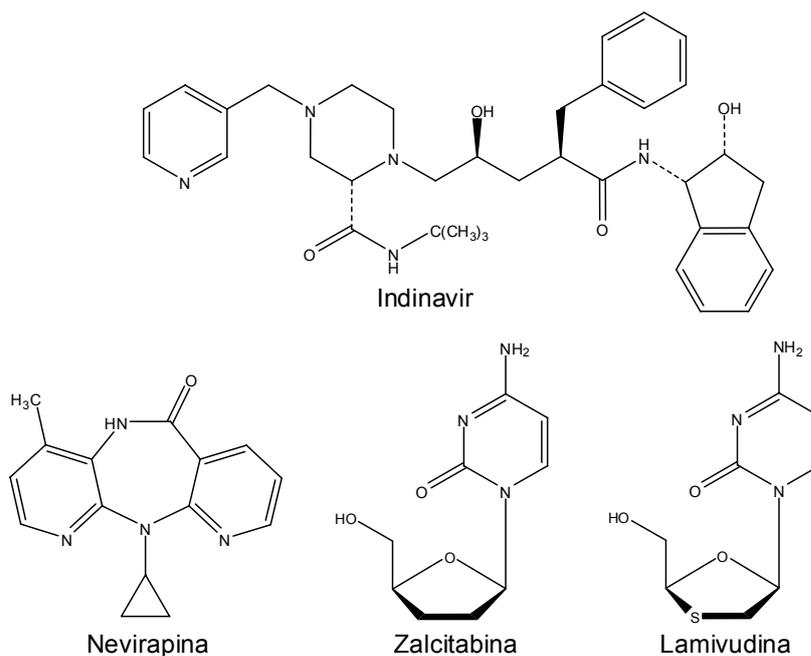


Figura 7.1 – Estrutura química do lamivudina, nevirapina, indinavir e zalcitabina

A figura 7.2 mostra um eletroferograma reconstituído de uma mistura de padrões em urina, mostrando que mesmo com migrações próximas a espectrometria de massas pode ser utilizada para resolução dos compostos.

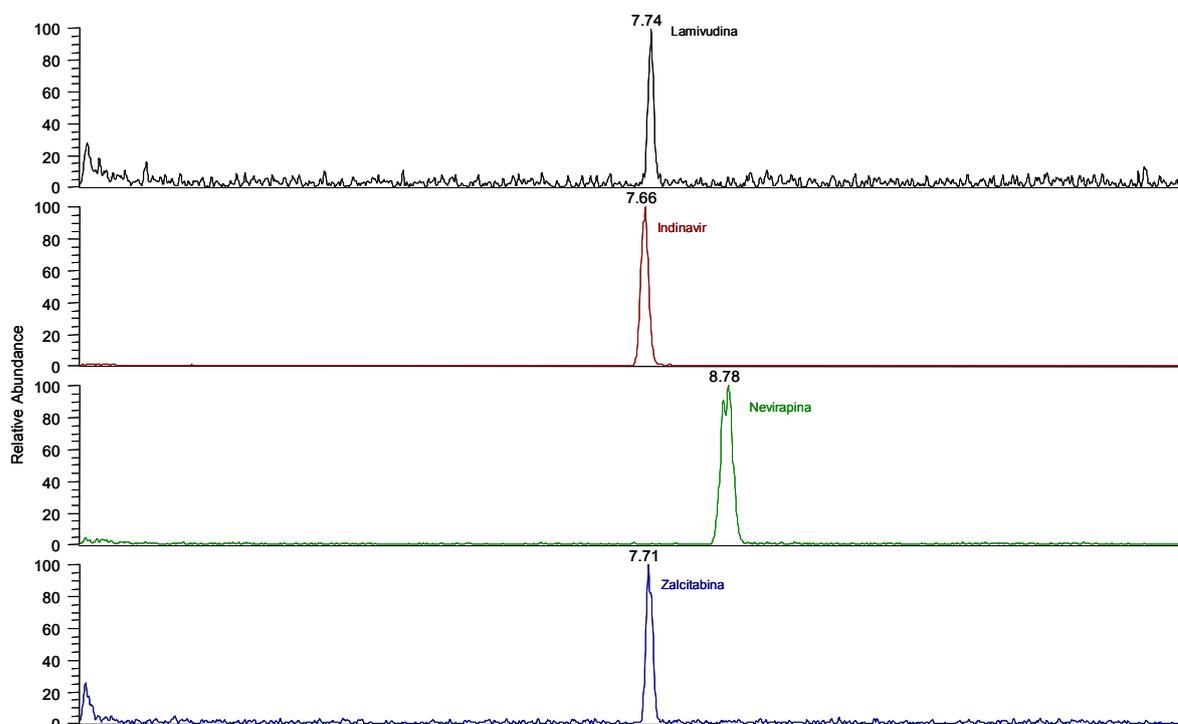


Figura 7.2 – Mistura de padrões de antiretrovirais na concentração $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Eletrólito $400 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido fórmico, 30 kV, tempos de injeção 10 s/25 psi. Líquido auxiliar: 0,5 % de ácido fórmico em MeOH:Água (1:1).

7.6 – Figuras de mérito da metodologia

A sensibilidade do método foi avaliada através de diluições sucessivas de uma amostra de urina fortificada com $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada antiretroviral. Com a metodologia proposta conseguiu-se chegar a concentração mínima de $0,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, como pode ser observado no eletroferograma reconstituído na Figura 7.5.

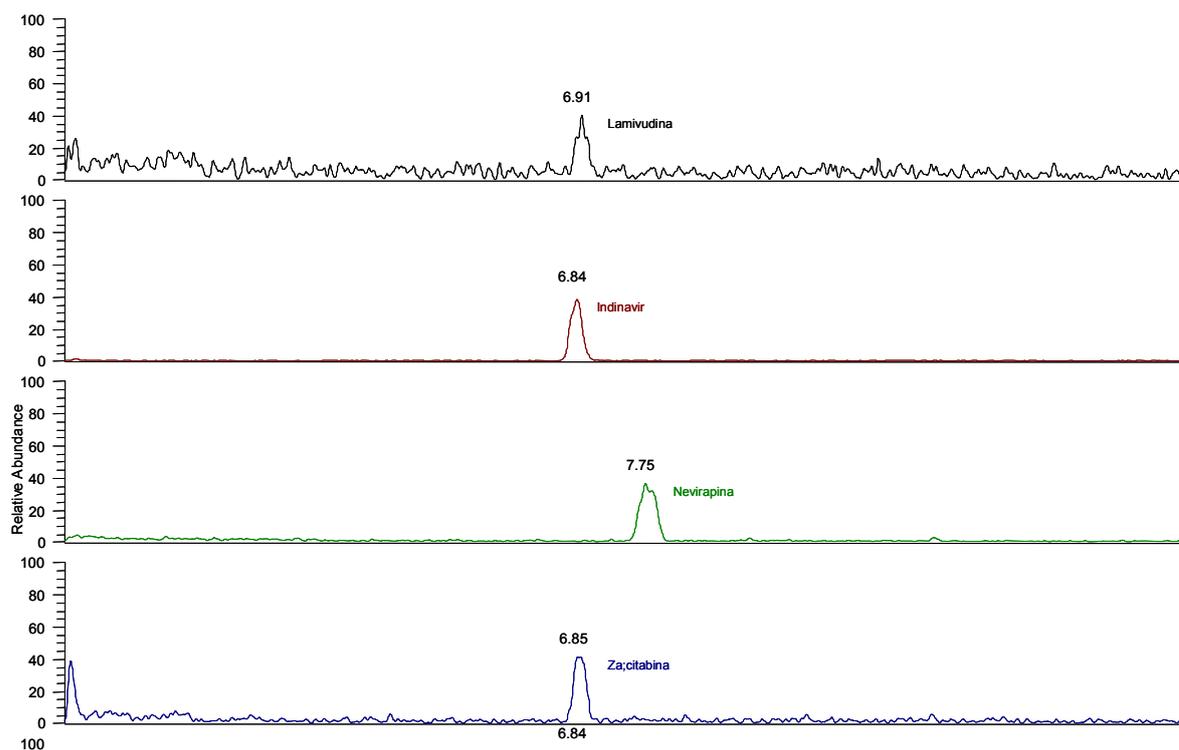


Figura 7.3 – Mistura de padrões de antiretrovirais na concentração $0,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Eletrólito 400 mmol.L^{-1} de ácido fórmico, 30 kV, tempos de injeção 10 s/25 psi. Líquido auxiliar: 0,5 % de ácido fórmico em MeOH:Água (1:1).

7.9 – Conclusões

A metodologia proposta possibilita uma detecção inequívoca das espécies presentes na urina dos antiretrovirais estudados, mostrando a possibilidade de aplicação da técnica em estudos clínicos para acompanhamento do tratamento em pacientes.

7.10 – Referências

1. Coordenação Nacional de DST e AIDS, <http://www.unaids.gov.br>, acessada em Maio 2007.
2. Moyer, T. P.; Temesgen, Z.; Enger, R.; Estes, L.; Charlson, J.; Oliver, L.; Wright, A. *Clinical Chemistry*, **1999**, 45, 1465.
3. Pereira, E. A., G. A. Micke, *et al.* Determination of antiretroviral agents in human serum by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A, v.1091, n.1-2, Oct 14, p.169-176. 2005.
4. Gutleben, W., K. Scherer, *et al.* Separation of 11 protease and reverse transcriptase inhibitors by capillary zone electrophoresis. Journal of Separation Science, v.26, n.12-13, Aug, p.1198-1202. 2003.
5. Fan, B. e J. T. Stewart. Determinations of zidovudine/didanosine/nevirapine and zidovudine/didanosine/ritonavir in human serum by micellar electrokinetic chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.30, n.4, Nov 7, p.955-960. 2002.
6. Tuan, N. D., W. Gutleben, *et al.* Simultaneous separation of fifteen approved protease and reverse transcriptase inhibitors for human immunodeficiency virus therapy by capillary electrophoresis. Electrophoresis, v.24, n.4, Feb, p.662-670. 2003.
7. Liu, C. C., J. S. Huang, *et al.* Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry of nucleosides and nucleotides: Application to phosphorylation studies of anti-human immunodeficiency virus nucleosides in a human hepatoma cell line. Electrophoresis, v.26, n.7-8, Apr, p.1424-1431. 2005.
8. Cahours, X., H. Dessans, *et al.* Determination at ppb level of an anti-human immunodeficiency virus nucleoside drug by capillary electrophoresis-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, v.895, n.1-2, Oct 20, p.101-109. 2000.

CAPÍTULO 8
CONSIDERAÇÕES FINAIS

8.1 – Conclusões Finais

Os métodos propostos para a análise dos fármacos em estudo em formulações farmacêuticas (Capítulo 4, 5 e 6), mostram boa linearidade, precisão, exatidão e tempo de análise relativamente pequeno. Com base nas características de desempenho, os métodos propostos podem ser utilizados em análises de rotina na indústria farmacêutica, para monitoração dos produtos acabados bem como na qualificação de matérias primas. No caso da metodologia proposta para a análise de nevirapina o método proposto mostrou robustez adequada através da comparação das análises nos dois equipamentos.

O desenvolvimento de uma metodologia por CE-MS, mostrou que o acoplamento com a espectrometria de massa pode levar a uma detecção inequívoca das espécies presentes na matriz biológica (urina), não necessitando de uma abertura da amostra.

8.2 – Perspectivas Futuras

Uma próxima etapa a ser estudada com os antiretrovirais estudados e outros disponíveis no laboratório consiste na avaliação prática/teórica das constantes de interação analitos-micela para determinação das relações estrutura-retenção (QSRR) e uma possível determinação da relação estrutura-atividade (QSAR). Outra possibilidade a ser avaliada futuramente consiste no estudo teórico do mecanismo de separação por MEKC com a adição de um complexante auxiliar (ciclodextrinas).

A metodologia proposta para análise por CE-MS, uma vez que não atinge os limites de detecção necessários para análise em amostras biológicas, faz com que se realize estudos de pré-concentração. As estratégias de pré-concentração serão feitas utilizando-se cartuchos de SPE e estudos de injeção eletrocinética para uma melhoria na sensibilidade da metodologia.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)