

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Carina de Almeida Bastos

Desenvolvimento e Validação de um Método para a Determinação Simultânea de Mesilato de Nelfinavir e Duas Impurezas por Cromatografia Eletrocínética Micelar (CEM)

Juiz de Fora

2015

Carina de Almeida Bastos

Desenvolvimento e Validação de um Método para a Determinação Simultânea de Mesilato de Nelfinavir e Duas Impurezas por Cromatografia Eletrocínética Micelar (CEM)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira.
Coorientador: Dr. Marcus Vinícius Nora de Souza.

Juiz de Fora

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bastos, Carina de Almeida.

Desenvolvimento e Validação de um Método para a Determinação Simultânea de Mesilato de Nelfinavir e Duas Impurezas por Cromatografia Eletrocínética Micelar (CEM) / Carina de Almeida Bastos. -- 2015.

67 p.

Orientador: Marccone Augusto Leal de Oliveira

Coorientador: Marcus Vinícius Nora de Souza

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

1. Nelfinavir. 2. Impurezas. 3. Cromatografia Eletrocínética Micelar. 4. Planejamento Fatorial Misto. 5. Teste de Youden. I. Oliveira, Marccone Augusto Leal de, orient. II. Souza, Marcus Vinícius Nora de, coorient. III. Título.

Carina de Almeida Bastos

Desenvolvimento e Validação de um Método para a Determinação Simultânea de Mesilato de Nelfinavir e Duas Impurezas por Cromatografia Eletrocínética Micelar (CEM)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em: 20 de março de 2015

BANCA EXAMINADORA

Doutor Marcone Augusto Leal de Oliveira - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Doutor Marcus Vinícius Nora de Souza - Coorientador
Instituto de Tecnologia em Fármacos – Far Manguinhos

Doutor Gerson Antônio Pianetti
Universidade Federal de Minas Gerais

Doutor Keyller Bastos Borges
Universidade Federal de São João del-Rei

Doutor Júlio César José da Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

Doutora Nádia Rezende Barbosa Raposo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho a todas as mulheres que precisam conciliar a vida acadêmica, não somente com a vida profissional, mas também com a maternidade...

AGRADECIMENTOS

Ao Henrique, que tinha apenas 5 meses quando iniciei o doutorado, e agora está com quase 5 aninhos... Agradeço a você, filho, pois você é a razão de todas as decisões da minha vida!

Ao meu marido Harleson, por apoiar minhas decisões, e por ser meu companheiro há 13 anos!

A toda a minha família, em especial, ao meu pai, Paulo, e à minha mãe, Tania, por terem me dado suporte e pelo amor incondicional!

Ao Prof. Marcone, meu orientador, não existem palavras para expressar o meu agradecimento por todos esses anos... Nos conhecemos quando me matriculei na disciplina “Métodos de separação” como disciplina isolada antes mesmo de cursar o mestrado. Era a primeira vez que o Professor ministrava esta disciplina, há aproximadamente dez anos atrás. Minha admiração por, durante toda essa caminhada, nunca ter se esquecido de que, antes de ser um pesquisador, é também um Professor!

Ao Professor Marquinhos, por estar sempre disposto a me orientar, espero que possamos continuar nossa colaboração!

À Claudinha, apesar de não nos conhecermos pessoalmente, obrigada pelo trabalho em conjunto à distância!

Ao Prof. Rafael, sua liderança trouxe uma contribuição inestimável ao grupo!

Aos amigos do GQAQ, melhor do que o aprendizado individual é o aprendizado coletivo... Obrigada por todos os momentos, seja nas reuniões de grupo, prévias, seminários, aulas, tutorias, seja no laboratório, na cantina, nas viagens e nas confraternizações!

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite para participação da mesma;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 475055/2011-0 e 301689/2011-3); à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG: CEX-PPM 00398-13); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à UFJF pelo apoio financeiro.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais retorna ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

Um método cromatográfico eletrocínético micelar para a determinação simultânea do mesilato de nelfinavir e das impurezas ácido 3-hidroxi-2-metilbenzóico e benzoato de (2*R*,3*R*)-4-((3*S*,4*aS*,8*aS*)-3-(*terc*-butilcarbamoil)octahidroisoquinolina-2(1*H*)-il)-3-hidroxi-1-(feniltio)butano-2-amônio, com tempo de análise de 25 minutos, foi proposto. O eletrólito composto por tampão tetraborato de sódio (pH 9,24; 25 mmol L⁻¹), dodecil sulfato de sódio (9 mmol L⁻¹) e metanol (10%, v/v) foi otimizado utilizando planejamento fatorial misto, com detecção direta em 200 nm. Após avaliação das figuras de mérito seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (Teste de Youden), o método foi aplicado na análise do mesilato de nelfinavir e suas impurezas em uma formulação farmacêutica (comprimidos). O método otimizado pode ser útil na determinação desses analitos em processos de monitoramento de síntese, matérias-primas e formulações farmacêuticas, oferecendo como vantagens baixo consumo de solventes, pequena demanda de amostra e uso de colunas não específicas.

Palavras-chave: Nelfinavir. Impurezas. Cromatografia Eletrocínética Micelar. Planejamento Fatorial Misto. Teste de Youden.

ABSTRACT

A methodology for the simultaneous determination of nelfinavir mesylate and the impurities 3-hydroxy-2-methylbenzoic acid and (2*R*,3*R*)-4-((3*S*,4*aS*,8*aS*)-3-(tert-butylcarbonyl)octahydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)-3-hydroxy-1-(phenylthio)butan-2-aminium benzoate by micellar electrokinetic chromatography, with an analysis time of 25 min, was proposed. An electrolyte composed of sodium tetraborate buffer (pH 9.24; 25 mmol L⁻¹), sodium dodecyl sulphate (9 mmol L⁻¹) and methanol (10%, v/v) was optimized using a mixed-level factorial design, with direct detection at 200 nm. After evaluating some figures of merit, such as selectivity, linearity, precision, limit of detection, limit of quantification, accuracy and robustness (Youden's test), the method was successfully applied to the analysis of nelfinavir mesylate and its impurities in a pharmaceutical formulation (tablets). The optimized methodology is demonstrated to be useful in the determination of these analytes in a synthesis monitoring process, in raw materials and in pharmaceutical formulations, while offering low solvent consumption, requiring a small sample and using non-specific columns as advantages.

Keywords: Nelfinavir. Impurities. Micellar Electrokinetic Chromatography. Mixed Factorial Design. Youden's Test.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Representação esquemática do HIV.....	15
Figura 2	– Visão global da infecção por HIV.....	16
Figura 3	– Estruturas químicas do mesilato de nelfinavir e de suas impurezas.....	17
Figura 4	– Síntese do intermediário sulfato cíclico 6.....	18
Figura 5	– Síntese do mesilato de nelfinavir.....	18
Figura 6	– Esquema do instrumental básico da EC.....	20
Figura 7	– Representação dos perfis dos fluxos eletrosmótico e hidrodinâmico.....	22
Figura 8	– Princípio da separação envolvido em CEM.....	30
Figura 9	– Intervalo característico de eluição em CEM.....	33
Figura 10	– Espectros eletrônicos do mesilato de nelfinavir e das impurezas A, B1 e B2 obtidos no equipamento de Eletroforese Capilar através do detector DAD.....	41
Figura 11	– Curvas de mobilidade efetiva de mesilato de nelfinavir (×), impureza A (-), impureza B1 (*) e impureza B2 (Δ).....	42
Figura 12	– Eletroferograma da mistura de padrões: (1) Impureza A (2) Impureza B1 (3) Impureza B2 (4) Mesilato de nelfinavir.....	46
Figura 13	– Eletroferograma da mistura de padrões: (1) Impureza A (2) Impureza B1 (3) Impureza B2 (4) Mesilato de nelfinavir.....	47
Figura 14	– Eletroferograma da mistura de padrões: 100 mg L ⁻¹ (1) Impureza A (2) Impureza B1 (3) Impureza B2 (4) Mesilato de nelfinavir.....	49
Figura 15	– Eletroferograma da mistura de padrões contendo 100 mg L ⁻¹ das impurezas A e B; e 20000 mg L ⁻¹ do mesilato de nelfinavir: (1) Impureza A (2) Impureza B1 (3) Impureza B2 (4) Mesilato de nelfinavir.....	50
Figura 16	– Eletroferograma da amostra: (A) contendo 20000 mg L ⁻¹ de mesilato de nelfinavir (4); (B) contendo 100 mg L ⁻¹ de mesilato de nelfinavir (4).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Recomendações para início da TARV em pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA).....	16
Tabela 2 – Mobilidade eletroforética (μ_{ep}) dos compostos de interesse nas condições experimentais iniciais.....	43
Tabela 3 – Matriz do planejamento fatorial misto contendo fatores e níveis.....	45
Tabela 4 – Resultados obtidos do estudo de linearidade.....	52
Tabela 5 – DPR (%) obtidos da repetibilidade e valores de LD e LQ (mg L^{-1}).....	53
Tabela 6 – Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez.....	54
Tabela 7 – Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo Teste de Youden.....	54
Tabela 8 – Resultados obtidos nas oito condições realizadas para avaliação da robustez.....	55
Tabela 9 – Efeitos dos parâmetros analíticos no tempo de migração (min), na razão do tempo de migração (t_0/t_{mc}) e no fator de separação (α) do método proposto.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês, <i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
BGE	Eletrólito, do inglês, <i>Background Electrolyte</i>
CAE	Eletroforese Capilar de Afinidade, do inglês, <i>Capillary Affinity Electrophoresis</i>
CEC	Eletrocromatografia Capilar, do inglês, <i>Capillary Electrochromatography</i>
CEM	Cromatografia Eletrocinética Micelar, do inglês, <i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i>
CGE	Eletroforese Capilar em Gel, do inglês, <i>Capillary Gel Electrophoresis</i>
CIEF	Focalização Isoelétrica Capilar, do inglês, <i>Capillary Isoelectric Focusing</i>
CITP	Isotacoforese Capilar, do inglês, <i>Capillary Isotachophoresis</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
CSE	Eletroforese Capilar de Peneiramento, do inglês, <i>Capillary Sieving Electrophoresis</i>
DAD	Detector de arranjo de diodos
d.e.	Diâmetro externo
d.i.	Diâmetro interno
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPR	Desvio padrão relativo
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
E	Campo elétrico
EC	Eletroforese Capilar
ECZ	Eletroforese Capilar de Zona
EKC	Cromatografia Eletrocinética, do inglês, <i>Electrokinetic Chromatography</i>
FEO	Fluxo eletrosmótico
HIV/VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
LD	Limite de detecção
L_{ef}	Comprimento efetivo do capilar
LQ	Limite de quantificação
L_{tot}	Comprimento total do capilar
MeOH	Metanol

N	Número de pratos teóricos
PFM	Planejamento fatorial misto
PVHA	Pessoas vivendo com HIV/AIDS
R_s	Resolução
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TARV	Terapia antirretroviral
TB	Tetraborato de sódio
t_{eo}	Tempo de migração do fluxo eletrosmótico
t_m	Tempo de migração
t_{mc}	Tempo de migração da micela
t_0	Tempo de migração do fluxo eletrosmótico
V_{eo}	Velocidade eletrosmótica
V_{ep}	Velocidade eletroforética

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Fator de separação
α	Grau de dissociação
k'	Fator de capacidade
μ_{ef}	Mobilidade efetiva
μ_{eo}	Mobilidade eletrosmótica
μ_{ep}	Mobilidade eletroforética
μ_{ob}	Mobilidade observada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	JUSTIFICATIVA.....	15
1.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.2.1	Eletoforese Capilar (EC)	20
1.2.1.1	<i>Mobilidade eletrosmótica</i>	23
1.2.1.2	<i>Mobilidade eletroforética</i>	23
1.2.1.3	<i>Mobilidade observada</i>	24
1.2.1.4	<i>Tempo de migração</i>	24
1.2.1.5	<i>Mobilidade efetiva</i>	24
1.2.2	Cromatografia Eletrocinética Micelar (CEM)	30
1.2.2.1	<i>Vantagens e Limitações</i>	32
1.2.2.2	<i>Causas de alargamento de bandas</i>	33
1.2.3	Análise do nelfinavir por EC	34
2	OBJETIVOS	36
2.1	OBJETIVO GERAL.....	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3	PARTE EXPERIMENTAL	37
3.1	MATERIAIS	37
3.1.1	Reagentes e padrões analíticos	37
3.1.2	Instrumentação	37
3.2	MÉTODOS	38
3.2.1	Preparo do padrão	38
3.2.2	Preparo da amostra	38
3.2.3	Procedimentos analíticos	39
3.2.4	Curva de calibração externa	39
3.2.5	Razão do tempo de migração (t_0 / t_{mc})	39
3.3	PRODUÇÃO, MINIMIZAÇÃO E DISPOSIÇÃO FINAL DE RESÍDUOS.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA	41
4.2	ESTUDO PRELIMINAR.....	42
4.3	PROCEDIMENTOS DE VALIDAÇÃO.....	51
4.3.1	Seletividade e linearidade	51

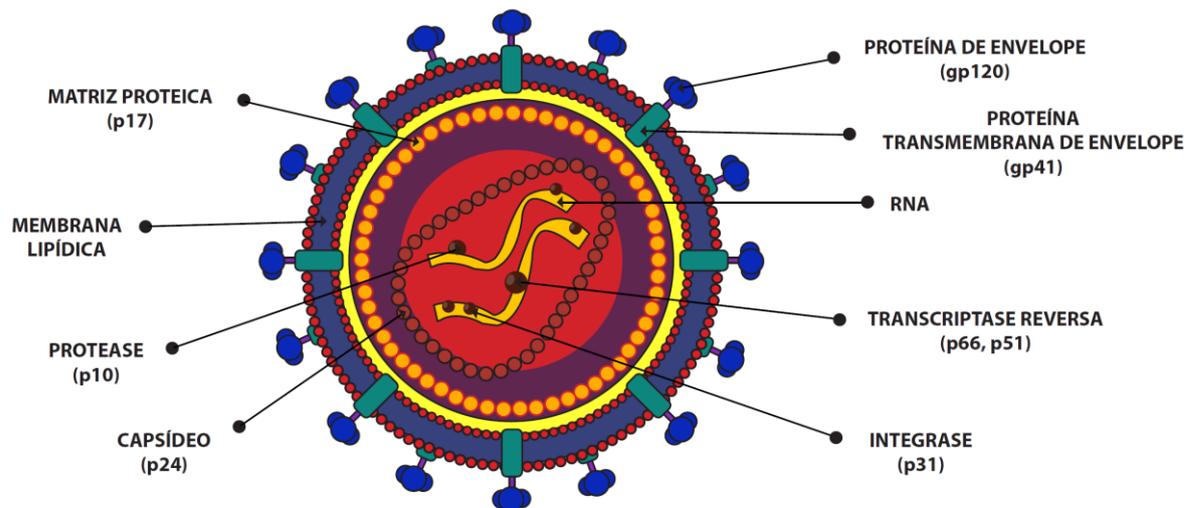
4.3.2	Precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	52
4.3.3	Exatidão	53
4.3.4	Robustez	53
4.4	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA EM UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA (COMPRIMIDOS)	56
5	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE A – Material Suplementar	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, “Acquired Immuno Deficiency Syndrome”) é uma doença infecciosa causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, “Human Immunodeficiency Virus”) (Figura 1). O HIV difere dos demais vírus porque ataca e danifica o sistema imunológico. Um dos componentes do sistema imunológico são os linfócitos T CD4+ que atacam diretamente o microorganismo invasor. Este vírus, ao infectar os linfócitos T CD4+, conduz à falta de coordenação do sistema imunológico e à sua progressiva inoperância, acabando por estabelecer uma imunodeficiência [1].

Figura 1 – Representação esquemática do HIV

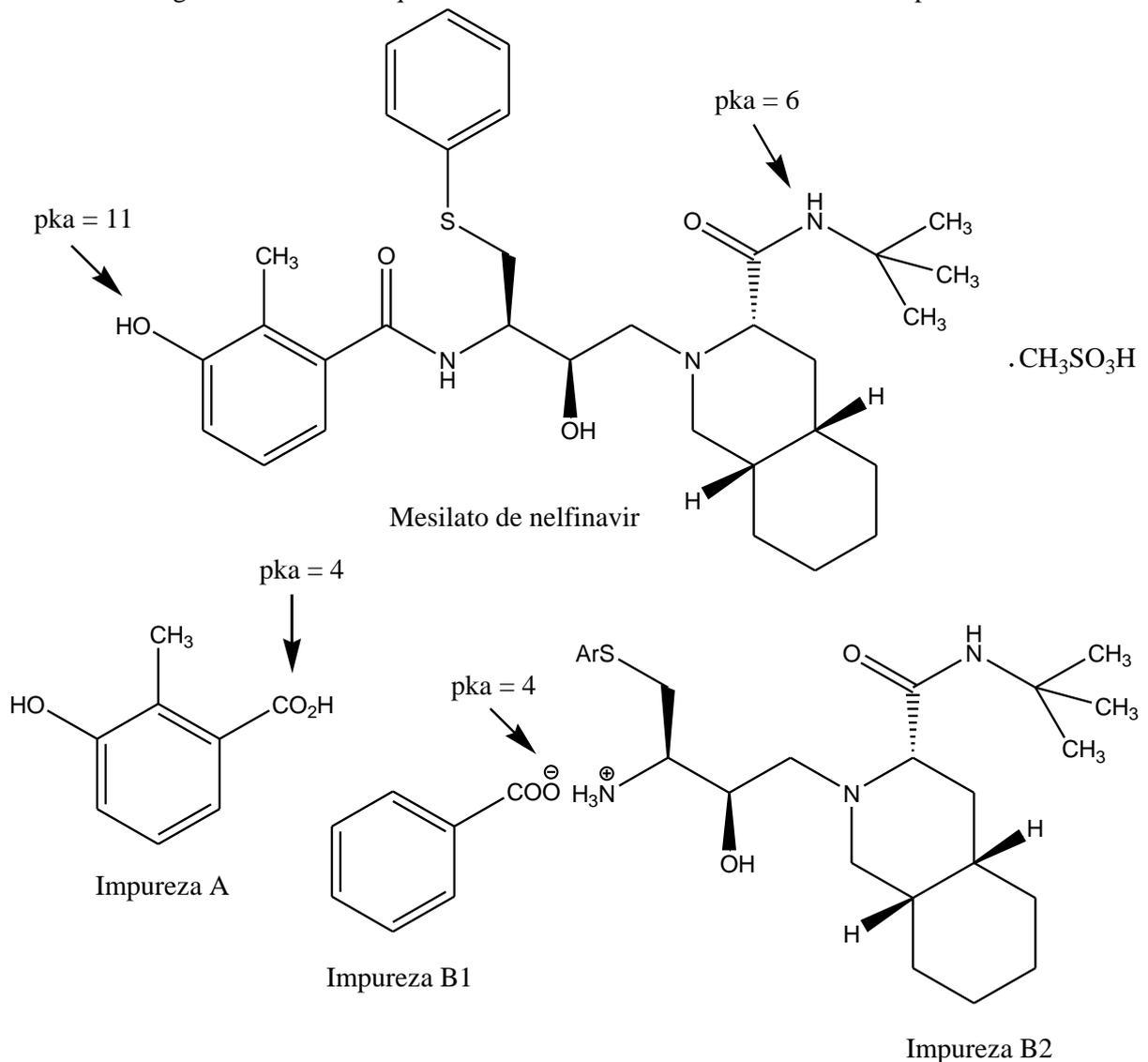


Fonte: BRASIL, 2014 [2]

O número de casos de AIDS registrados até 2010 foi de 34 milhões (Figura 2) e a projeção para 2030 é de que a AIDS seja a terceira causa de mortes no mundo [3].

Para a TARV, existem diferentes fármacos que atuam em diferentes etapas do ciclo de replicação do vírus, entre eles fármacos que inibem a protease, uma enzima essencial para a maturação do vírus [1]. Entre os inibidores de protease, encontra-se o mesilato de nelfinavir (metanossulfonato de (3*S*,4*aS*,8*aS*)-*N*-(*terc*-butil)-2-((2*R*,3*R*)-2-hidroxi-3-(3-hidroxi-2-metilbenzamido)-4-(feniltio)butil)decahidroisoquinolina-3-carboxamida), objeto deste estudo (Figura 3).

Figura 3 – Estruturas químicas do mesilato de nelfinavir e de suas impurezas

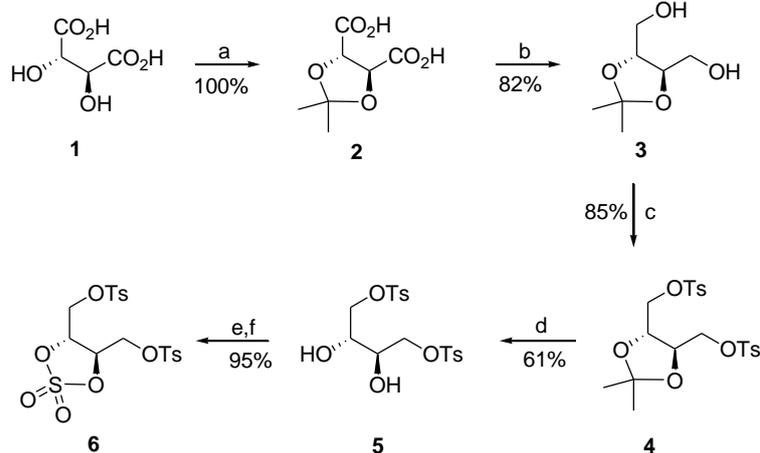


Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

O mesilato de nelfinavir consta nos Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em adultos [6] e em crianças e adolescentes [7] do Ministério da Saúde. Com a expiração da patente do medicamento em 2014 [8], é importante

que outros fabricantes produzam o fármaco, para que os custos com o tratamento possam ser reduzidos. Várias vias sintéticas estão descritas na literatura para a síntese do mesilato de nelfinavir [9-19]. Dentre as quais, a rota a partir do ácido *D*-tartárico 1, via reação do intermediário sulfato cíclico 6 com ftalimida de potássio (Figuras 4 e 5).

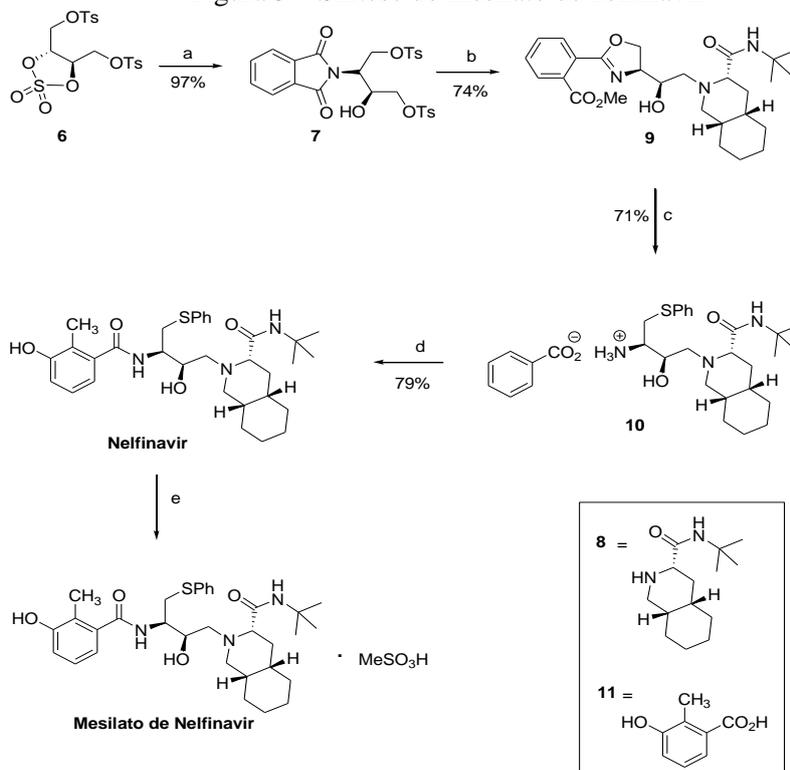
Figura 4 – Síntese do intermediário sulfato cíclico 6



a) DMP / *p*-TsOH / MeOH; b) NaBH₄ / EtOH; c) *p*-TsCl / NEt₃ / MTBE; d) EtOH / 1N HCl, refluxo; e) SOCl₂ / CH₂Cl₂ / r.t., 18h; f) cat. RuCl₃ / NaIO₄ / CH₃CN / H₂O

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Figura 5 – Síntese do mesilato de nelfinavir



a) PhThNK / H₂SO₄; b) 8 / K₂CO₃ / CH₃CN / MeOH; c) 1) PhSH / KHCO₃ / THF; 2) etanolamina / ácido benzóico; d) 1) 11 / EtOH; 2) NaOH; e) MeOH / CH₂Cl₂ / MeSO₃H

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Nesta rota sintética, podem estar presentes as seguintes impurezas (como citado na página 18): ácido 3-hidroxi-2-metilbenzóico (impureza A) e benzoato de (2*R*,3*R*)-4-((3*S*,4*aS*,8*aS*)-3-(*terc*-butilcarbamoil)octahidroisoquinolina-2(1*H*)-il)-3-hidroxi-1-(feniltio)butano-2-amino (impureza B).

Dentre as etapas para que um fármaco possa ser produzido e disponibilizado para uso, encontra-se a etapa de seu controle da qualidade, que deve conter informações técnicas do mesmo, como especificações dos testes de doseamento e de impurezas, e descrição do método analítico utilizado, incluindo sua validação [20].

Vários métodos, tanto por eletroforese capilar (EC) quanto por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para a quantificação do mesilato de nelfinavir encontram-se disponíveis na literatura [21-26]. Seshachalam e colaboradores [21] desenvolveram um método por CLAE para a quantificação do mesilato de nelfinavir e de cinco impurezas provenientes de outra rota de síntese em matérias-primas e formulações farmacêuticas. Jing e colaboradores [22] desenvolveram um método por CLAE para a determinação do mesilato de nelfinavir na presença de seus produtos de degradação e de três impurezas. Entretanto, é importante ressaltar que não foram encontradas na literatura, até o momento, métodos capazes de analisar, simultaneamente, o mesilato de nelfinavir e as mesmas impurezas provenientes da rota sintética descrita neste trabalho. Cabe ainda salientar que a rota de síntese alternativa demonstrada nas Figuras 4 e 5 sinaliza como uma proposta viável para a produção do fármaco uma vez que a patente está expirada.

A EC tem sido estabelecida como uma técnica versátil e robusta, proporcionando separações rápidas, eficientes e automatizadas, com pequenas quantidades de amostra, solventes e reagentes, sendo mais "eco-friendly" do que a CLAE [27, 28]. A Cromatografia Eletrocínética Micelar (CEM), um modo de EC, torna possível a separação de compostos neutros [29]. Assim, é proposto neste estudo o desenvolvimento de um método para a determinação simultânea do mesilato de nelfinavir e suas impurezas utilizando a CEM, o qual incluiu a otimização do método de análise usando planejamento de experimentos, a validação do método analítico proposto e sua aplicação em uma amostra real.

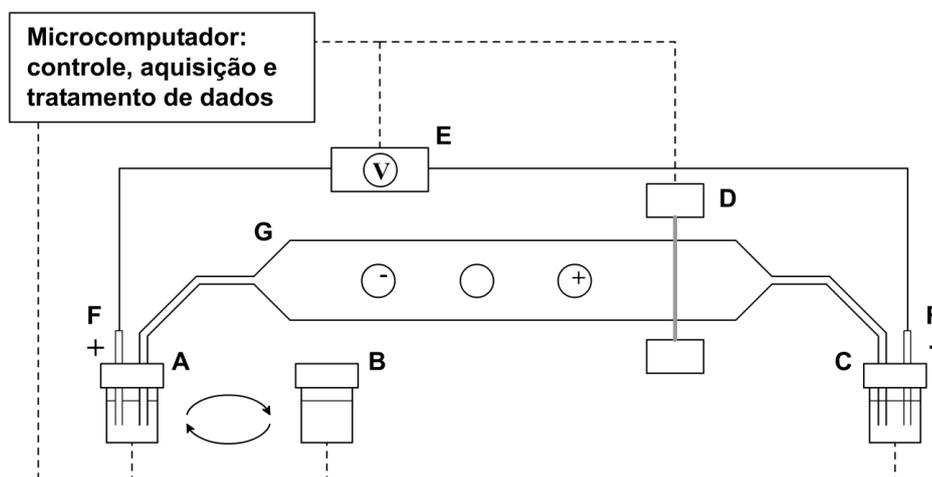
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Eletroforese Capilar (EC)

A EC é uma técnica de separação, que opera em meio líquido, baseada na migração diferenciada de compostos neutros, íons solvatados e espécies ionizáveis através da aplicação de um potencial elétrico da ordem de kV em um tubo capilar, contendo um sistema de eletrólito normalmente tamponado. Estas características associadas a algumas vantagens como alta eficiência (geralmente excede 10^5 pratos teóricos), tempos de análise apreciavelmente curtos, pequena demanda de amostra (com volumes tipicamente da ordem de 1 a 10 nL) e baixo consumo de solventes orgânicos apontam a EC uma técnica muito atraente no cenário analítico [30].

O esquema simplificado da EC está representado na Figura 6. Os comandos para controle, aquisição e tratamento de dados são realizados mediante interface com um computador.

Figura 6 – Esquema do instrumental básico da EC. Mostrando: os reservatórios de entrada de eletrólito (A), de amostra (B) e de saída de eletrólito/amostra (C); a detecção (D); um sistema de fornecimento de alta voltagem (E), aplicada ao eletrólito através de eletrodos de platina (F); e o capilar (G) situado em ambiente termostatzado. O diâmetro do capilar foi ampliado desproporcionalmente para facilitar a visualização dos analitos no seu interior



Fonte: VAZ, 2011 [31]

A EC tem sido aplicada para análise das mais variadas matrizes, entre as quais se destacam: farmacêuticas (antibióticos, vitaminas, hormônios, parabenos, fitoquímicos), alimentícias (ácidos graxos, ácidos orgânicos, edulcorantes), controle de qualidade de biocombustíveis (etanol, biodiesel), análise de proteínas, DNA, polímeros, matrizes biológicas (metabolômica e lipidômica), monitoramento ambiental (nitrito, nitrato, amônio), área *forense*, explosivos, etc.

Em EC, a separação dos analitos é conduzida em tubos capilares (canal de migração) de sílica fundida, Pyrex ou Teflon com dimensões que podem variar de 15 a 100 μm de diâmetro interno (d.i.), 360 a 400 μm de diâmetro externo (d.e.) e 50 a 100 cm de comprimento. A geometria do capilar (elevada área superficial interna em comparação ao volume) favorece a dissipação do calor (oriunda do efeito Joule – geração de calor devido à passagem de corrente elétrica), sendo possível o estabelecimento de campos elétricos substancialmente elevados (100 - 600 V/cm), resultando em separações de alta eficiência, alta resolução e curtos tempos de análise [32].

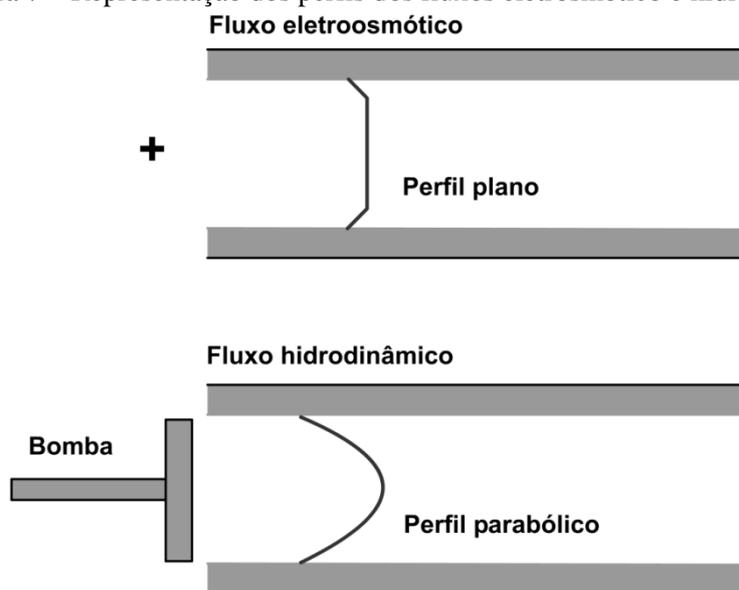
Uma característica importante em análises por EC é a presença de um fluxo de solução como um todo (geralmente no sentido introdução-deteção) denominado fluxo eletrosmótico (FEO). Este fenômeno é fortemente relacionado às propriedades da superfície interna do capilar [33].

No caso dos capilares de sílica fundida, a sílica (SiO_2) precisa ser funcionalizada com a passagem de uma base forte, formando, na superfície, grupos silanóis (Si-OH). Quando um eletrólito é posteriormente inserido no capilar, a superfície interna se torna negativamente carregada, devido à ionização dos silanóis a grupos silanatos (Si-O^-), se o pH do eletrólito for maior ou igual a três. A parede interna do capilar eletricamente carregada atrai, por forças eletrostáticas e/ou de coesão, cátions provavelmente desidratados e moléculas orientadas de água do eletrólito (adsorção específica), formando uma camada imediatamente adjacente à superfície, a camada compacta. Nesta camada íons hidratados também são atraídos mais fracamente (adsorção não específica). A camada compacta não tem carga positiva suficiente para neutralizar a superfície negativa do capilar. Portanto, mais cátions hidratados são atraídos, formando uma nova camada, a camada difusa, nas proximidades da camada compacta. Na camada difusa, a concentração de carga positiva e as forças de atração decrescem com o aumento da distância à superfície, até atingir a concentração do próprio eletrólito. Este gradiente de concentração define os limites da camada difusa. As camadas compacta e difusa formam a dupla camada elétrica [32].

Quando é aplicada a diferença de potencial nas extremidades do capilar, os cátions solvatados são atraídos em sentido ao cátodo e arrastam todo o leito aquoso, induzindo o FEO. Na camada difusa, cátions mais próximos do eletrólito possuem movimento e os mais próximos da camada compacta permanecem imóveis. O limite entre os cátions móveis (camada móvel) e os fixos (camada fixa) define o plano de cisalhamento [34].

O FEO é caracterizado por um perfil de velocidade linear ou plano. Isto significa que um mesmo componente vetorial é adicionado aos íons de um determinado soluto, estando estes íons mais próximos ou não da parede do capilar (desde que na camada móvel). Isto minimiza o efeito de alargamento de banda do soluto, distinguindo a EC de outras técnicas de separação que apresentam um perfil parabólico de velocidade, oriundo do fluxo induzido por pressão (hidrodinâmico) [34]. Na Figura 7 são apresentados os perfis dos fluxos eletrosmótico e hidrodinâmico.

Figura 7 – Representação dos perfis dos fluxos eletrosmótico e hidrodinâmico



Fonte: VAZ, 2011 [31]

Uma vez que todas estas características instrumentais, combinadas com as propriedades cinéticas de analitos e eletrólitos podem ser exploradas de diversas formas, existem diferentes modos de CE: Eletroforese Capilar de Zona (ECZ, “Capillary Zone Electrophoresis”), Eletroforese Capilar de Afinidade (CAE, “Capillary Affinity Electrophoresis”), Eletroforese Capilar de Peneiramento (CSE, “Capillary Sieving Electrophoresis”), Eletroforese Capilar em Gel (CGE, “Capillary Gel Electrophoresis”), Focalização Isoelétrica Capilar (CIEF, “Capillary Isoelectric Focusing”), Isotacoforese Capilar (CITP, “Capillary Isotachophoresis”), Cromatografia

Eletrocinética (EKC, “Electrokinetic Chromatography”), Cromatografia Eletrocinética Micelar (CEM, “Micellar Electrokinetic Chromatography”), Cromatografia Eletrocinética em Microemulsão (MEEKC, “Microemulsion Electrokinetic Chromatography”) e a Eletrocromatografia Capilar (CEC, “Capillary Electrochromatography”) [35].

Neste trabalho será discutida apenas a Cromatografia Eletrocinética Micelar (CEM), uma vez que este foi o modo de EC proposto em função das características dos compostos de interesse. Dentro deste contexto, nos itens 1.2.1.1 a 1.2.1.5 serão introduzidas as definições dos termos relacionados às técnicas de eletromigração em capilares: mobilidades eletrosmótica, eletroforética, observada, efetiva e tempo de migração do analito de interesse, os quais são imprescindíveis para o entendimento dos fundamentos da CEM.

1.2.1.1 *Mobilidade eletrosmótica*

Velocidade eletrosmótica é o movimento de um líquido através de uma membrana (ou capilar) como consequência da aplicação de um campo elétrico. A velocidade eletrosmótica (V_{eo}) dividida pelo campo elétrico (E) é chamada de mobilidade eletrosmótica (μ_{eo}) [35].

1.2.1.2 *Mobilidade eletroforética*

Velocidade eletroforética é a velocidade que um analito carregado adquire sob ação de um campo elétrico, em relação ao eletrólito de corrida. A velocidade eletroforética (V_{ep}) dividida pelo campo elétrico (E) é chamada de mobilidade eletroforética (μ_{ep}). Mobilidades podem ser expressas com sinal negativo, pois a migração de solutos ou partículas pode ocorrer no sentido contrário àquele do campo elétrico (que é tomado como referência) [35].

1.2.1.3 Mobilidade observada

A mobilidade observada (μ_{ob}) de um determinado soluto é a soma das μ_{eo} e μ_{ep} [34].

1.2.1.4 Tempo de migração

Tempo de migração (t_m) é o tempo requerido para que o analito percorra o comprimento efetivo do capilar, L_{ef} , que é a distância entre os pontos de injeção e detecção [35].

1.2.1.5 Mobilidade efetiva

O conceito de mobilidade efetiva (μ_{ef}) é utilizado para descrever a migração de compostos existentes pelo menos sob duas formas químicas, ionizada e não-ionizada, em equilíbrio, que migram como um soluto único [32,34].

A μ_{ef} pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius, de acordo com a equação 1:

$$\mu_{ef} = \sum \alpha \mu_{ep} \quad (1)$$

Onde: μ_{ep} é a mobilidade eletroforética do analito em $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$;

α é o grau de dissociação.

As funções de distribuição dependem da magnitude das constantes de dissociação do soluto (pK_a) e determinam a predominância relativa das várias espécies num intervalo de pH. Desta forma, a Equação 1 sugere uma dependência indireta entre a mobilidade efetiva e o

pH do meio. A construção de curvas de mobilidade efetiva versus pH são excelentes indicadores das condições de pH mais propícias para a separação dos analitos de interesse ocorrer, ou seja, o pH onde as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos são maximizadas [34].

Para a construção dessas curvas, é necessária a realização de uma análise, sob condições experimentais determinadas, para cada analito. Desta análise, serão utilizados os dados de tempo de migração do analito e do FEO, voltagem aplicada e dimensões do capilar, para cálculo das mobilidades eletrosmótica (μ_{eo}), observada (μ_{ob}) e eletroforética (μ_{ep}) (Equações 2, 3 e 4, respectivamente).

$$\mu_{eo} = \frac{L_{ef} L_{tot}}{t_{eo} V} \quad (2)$$

$$\mu_{ob} = \mu_{eo} + \mu_{ep} \quad (3)$$

$$\mu_{ob} = \frac{L_{ef} L_{tot}}{t_m V} \quad (4)$$

Onde: L_{ef} é o comprimento efetivo do capilar em cm;

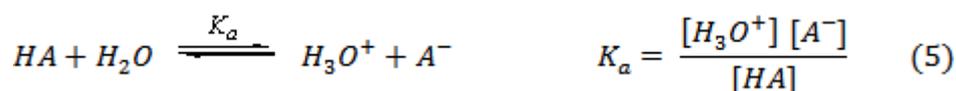
L_{tot} é o comprimento total do capilar em cm;

t_{eo} (ou t_0) é o tempo de migração do fluxo eletrosmótico em s;

V é a voltagem aplicada em V.

t_m é o tempo de migração do analito de interesse em s;

Em seguida, é necessário calcular o α para cada analito. Considerando-o como um ácido fraco HA, temos:



Isolando a concentração de cada espécie temos:

$$[HA] = \frac{[H_3O^+][A^-]}{K_a} \quad (6) \quad e \quad [A^-] = \frac{[HA] K_a}{[H_3O^+]} \quad (7)$$

E assim, é possível calcular o α de cada espécie.

Para a espécie HA, temos:

$$\alpha_{HA} = \frac{[HA]}{[HA] + [A^-]}$$

Substituindo $[A^-]$ pela equação 7,

$$\alpha_{HA} = \frac{[HA]}{[HA] + \frac{[HA] K_a}{[H_3O^+]}}$$

$$\alpha_{HA} = \frac{1}{1 + \frac{K_a}{[H_3O^+]}}$$

$$\alpha_{HA} = \frac{[H_3O^+]}{[H_3O^+] + K_a} \quad (8)$$

Para a espécie A^- , temos:

$$\alpha_{A^-} = \frac{[A^-]}{[HA] + [A^-]}$$

Substituindo $[HA]$ pela equação 6,

$$\alpha_{A^-} = \frac{[A^-]}{\frac{[H_3O^+][A^-]}{K_a} + [A^-]}$$

$$\alpha_{A^-} = \frac{1}{\frac{[H_3O^+]}{K_a} + 1}$$

$$\alpha_{A^-} = \frac{K_a}{[H_3O^+] + K_a} \quad (9)$$

Para um composto com dois valores de pKa, o mesmo deve ser considerado como um ácido diprótico:



A partir do equilíbrio químico acima, é possível encontrar a concentração das espécies:

$$[H_2A] = \frac{[H_3O^+][HA^-]}{K_{a1}} \quad (12)$$

$$[HA^-] = \frac{[H_2A]K_{a1}}{[H_3O^+]} \quad (13)$$

$$[HA^-] = \frac{[H_3O^+][A^{2-}]}{K_{a2}} \quad (14)$$

$$[A^{2-}] = \frac{[HA^-]K_{a2}}{[H_3O^+]} \quad (15)$$

Igualando as equações 13 e 14 pode-se encontrar a $[A^{2-}]$ em função de K_{a1} e K_{a2} :

$$\frac{[H_2A]K_{a1}}{[H_3O^+]} = \frac{[H_3O^+][A^{2-}]}{K_{a2}}$$

$$[A^{2-}] = \frac{[H_2A]K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2} \quad (16)$$

Então, é possível calcular o α de cada espécie.

Logo, α para a espécie H_2A é igual a:

$$\alpha_{H_2A} = \frac{[H_2A]}{[H_2A] + [HA^-] + [A^{2-}]}$$

$$\alpha_{H_2A} = \frac{[H_2A]}{[H_2A] + \frac{[H_2A]K_{a1}}{[H_3O^+]} + \frac{[H_2A]K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2}}$$

$$\alpha_{H_2A} = \frac{1}{1 + \frac{K_{a1}}{[H_3O^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2}}$$

$$\alpha_{H_2A} = \frac{[H_3O^+]^2}{[H_3O^+]^2 + [H_3O^+]K_{a1} + K_{a1}K_{a2}} \quad (17)$$

E, para a espécie HA^- :

$$\alpha_{HA^-} = \frac{[HA^-]}{[H_2A] + [HA^-] + [A^{2-}]}$$

$$\alpha_{HA^-} = \frac{\frac{[H_2A]K_{a1}}{[H_3O^+]}}{[H_2A] + \frac{[H_2A]K_{a1}}{[H_3O^+]} + \frac{[H_2A]K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2}}$$

$$\alpha_{HA^-} = \frac{\frac{[H_2A]K_{a1}}{[H_3O^+]}}{[H_2A] \left(1 + \frac{K_{a1}}{[H_3O^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2} \right)}$$

$$\alpha_{HA^-} = \frac{[H_2A]K_{a1}}{[H_3O^+]} \times \frac{1}{[H_2A] \left(1 + \frac{K_{a1}}{[H_3O^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2} \right)}$$

$$\alpha_{HA^-} = \frac{K_{a1}[H_3O^+]}{[H_3O^+]^2 + K_{a1}[H_3O^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad (18)$$

Para a espécie A^{2-} , temos:

$$\alpha_{A^{2-}} = \frac{[A^{2-}]}{[H_2A] + [HA^-] + [A^{2-}]}$$

$$\alpha_{A^{2-}} = \frac{\frac{[H_2A]K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2}}{[H_2A] + \frac{[H_2A]K_{a1}}{[H_3O^+]} + \frac{[H_2A]K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2}}$$

$$\alpha_{A^{2-}} = \frac{\frac{[H_2A]K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2}}{[H_2A] \left(1 + \frac{K_{a1}}{[H_3O^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2} \right)}$$

$$\alpha_{A^{2-}} = \frac{[H_2A]K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2} \times \frac{1}{[H_2A] \left(1 + \frac{K_{a1}}{[H_3O^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2} \right)}$$

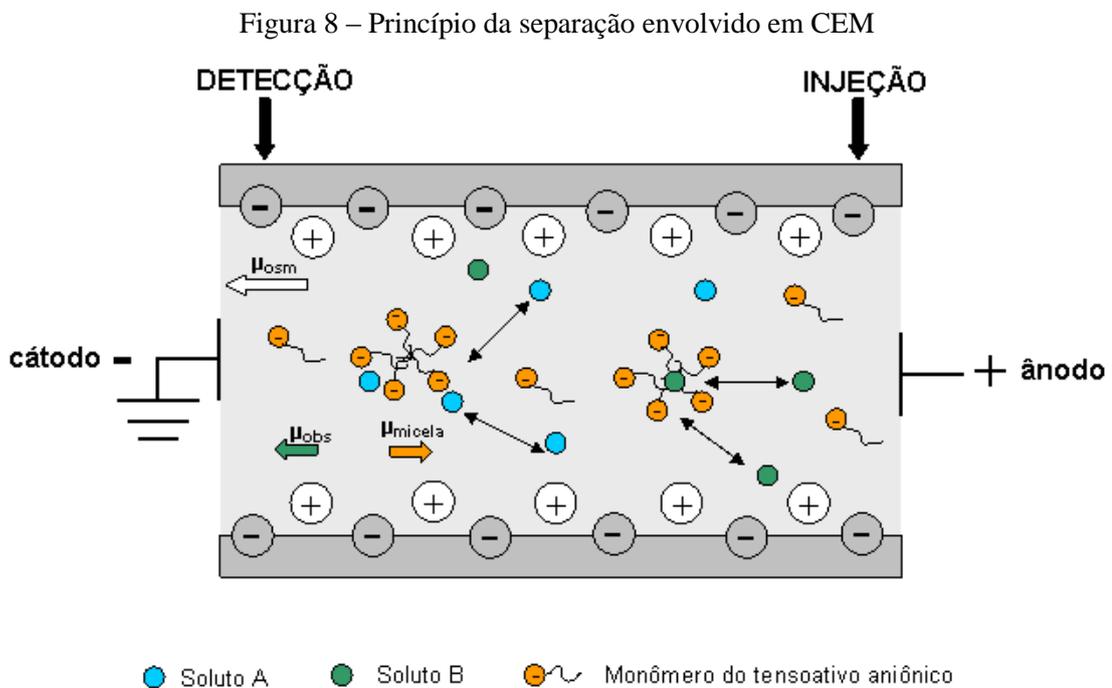
$$\alpha_{A^{2-}} = \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H_3O^+]^2 + K_{a1}[H_3O^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad (19)$$

A partir dos valores de pKa das substâncias de interesse é calculado o α das espécies em equilíbrio em diferentes valores de pH, e posteriormente, podem ser construído diagramas de distribuição, que são gráficos de α versus pH.

Após a determinação dos valores de μ_{ep} e α , a μ_{ef} de um analito pode ser obtida pela Equação 1. Em seguida, é possível construir as curvas de mobilidade efetiva, que são os gráficos de μ_{ef} versus pH.

1.2.2 Cromatografia eletrocinética micelar (CEM)

A CEM é uma modalidade de EC, introduzida por Terabe e colaboradores em 1984, capaz de separar moléculas neutras e íons simultaneamente, mediante a adição de surfactantes ao eletrólito condutor. Embora tenha sido idealizada para separar solutos neutros, a CEM não só pode auxiliar na separação de íons solvatados como tem sido amplamente empregada para tal [30]. Na Figura 8 é demonstrado o princípio da separação envolvido em CEM.



Fonte: FARIA, 2006 [36]

O surfactante rotineiramente utilizado é o dodecil sulfato de sódio (SDS), o qual forma micelas carregadas negativamente. Micelas são formadas rapidamente quando a concentração de surfactante excede um valor específico, conhecido como concentração micelar crítica (CMC), e existem em equilíbrio dinâmico com o monômero. Na ausência de micelas, todas as moléculas neutras alcançam o detector no tempo t_0 (migram em função da μ_{eo}), enquanto as espécies carregadas migram em função da contribuição das μ_{ep} e μ_{eo} . Se uma molécula neutra está em equilíbrio entre a solução livre e o interior das micelas, seu

tempo de migração muda, pois parte do tempo ela migra com a velocidade da micela, podendo ocorrer, assim, a separação. Logo, o controle do FEO é uma das variáveis importantes na otimização por CEM. Várias estratégias, tais como alteração das propriedades físico-químicas da solução (pH, força iônica, viscosidade e constante dielétrica), têm sido descritas na literatura no sentido de exercer um controle apropriado do FEO e, conseqüentemente, de se obter sucesso na separação [30].

A escolha de uma solução tampão adequada tem aplicações diretas na otimização da separação. A concentração das soluções tampões usadas em EC varia tipicamente entre 5 e 200 mmol L⁻¹. Altas concentrações podem comprometer a separação, pelo excesso de calor decorrente do efeito Joule. Baixas concentrações das soluções tampão podem aumentar a tendência de adsorção de certos solutos na parede do capilar e, portanto, ocasionar alargamento e distorção das bandas. Adicionalmente, em baixas concentrações, o FEO pode se tornar errático, o que dificulta a reprodutibilidade dos tempos de migração e conseqüentemente prejudica a identificação inequívoca dos solutos [30].

A concentração do tensoativo também pode influenciar na separação. Micelas são estruturas dinâmicas e, por conseguinte, estão sujeitas à variação de tamanho com o tempo, em decorrência do equilíbrio de troca entre o monômero e o N-mero. Solutos interagindo com micelas de diferentes tamanhos exibem um amplo intervalo de velocidade eletroforética e podem produzir bandas largas. O aumento da concentração do tensoativo pode contribuir para acelerar o processo de troca entre micela e monômero, melhorando a eficiência da separação [30].

Entre os aditivos de eletrólito comumente empregados em eletrocromatografia micelar, encontram-se os solventes orgânicos, os quais alteram: a CMC e, portanto, o volume micelar; a viscosidade e a constante dielétrica do eletrólito, resultando na variação da velocidade eletrosmótica [30]. Como os surfactantes iônicos são mais solúveis em misturas água/metanol que em misturas acetonitrila/água, o metanol é o solvente orgânico preferido [37].

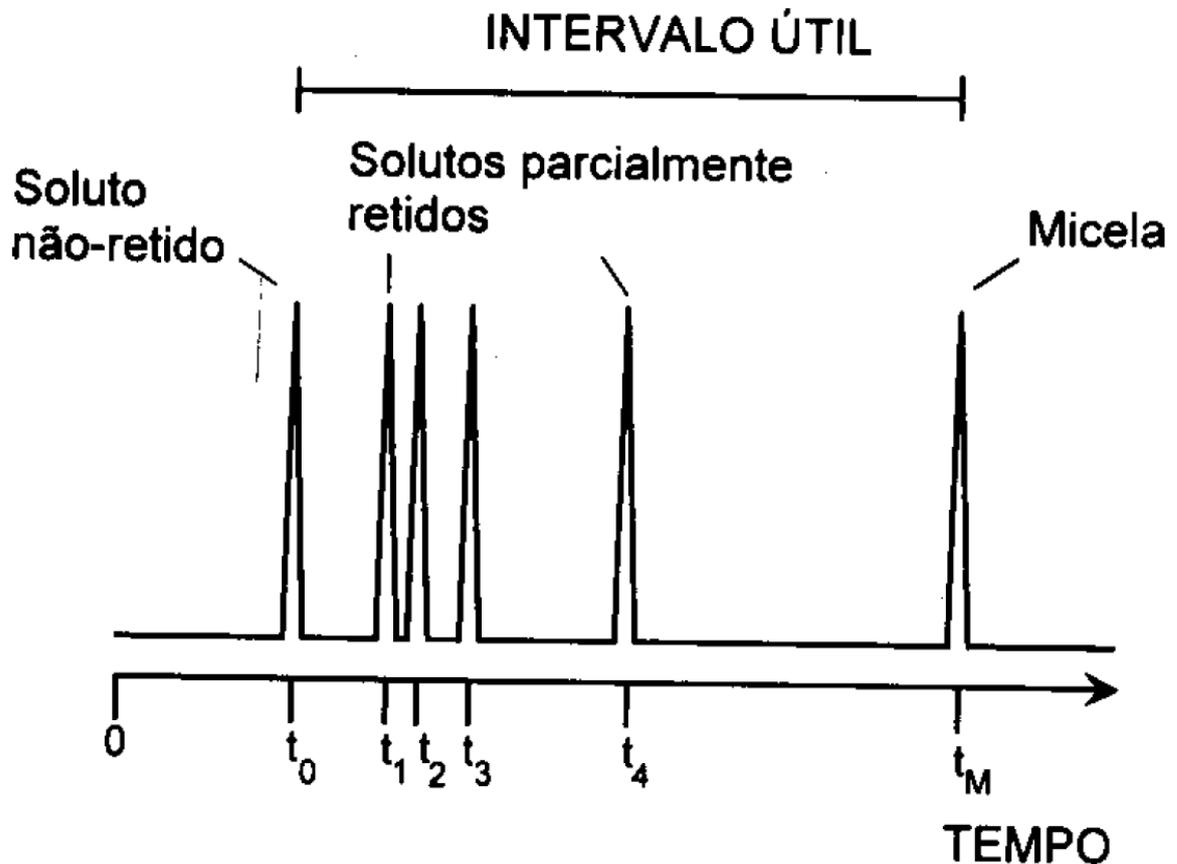
Por essas razões, os fatores discutidos anteriormente (concentração da solução tampão, do tensoativo e concentração do solvente orgânico) foram escolhidos para serem estudados durante o desenvolvimento do método de análise dos compostos de interesse.

1.2.2.1 *Vantagens e Limitações*

Em relação a outras técnicas alternativas de separação, a CEM oferece várias vantagens. É mais versátil que a ECZ em solução livre, pois utiliza a mesma instrumentação básica e explora, além das diferenças de mobilidade eletroforética para separar íons em solução, as diferenças de distribuição entre a fase micelar e o eletrólito para separar solutos neutros. Quando comparada às técnicas cromatográficas similares (pareamento iônico, por exemplo), apresenta eficiência maior, em decorrência das características inerentes ao FEO, particularmente do caráter linear do perfil radial da velocidade [30].

Apesar de ser uma técnica com extensa variedade de aplicações, a CEM apresenta limitações. O fato da razão entre o volume das fases ($V_{\text{micela}}/V_{\text{solução}}$) ser relativamente grande, associado ao fato de que micelas são instáveis em soluções aquosas contendo altos teores de solventes orgânicos, em geral, impossibilita o uso de CEM para solutos com forte caráter apolar, pois, nestas condições, tais solutos são completamente retidos pela micela, não sendo diferenciados quando atingem o detector. Além disso, em razão da velocidade e do volume efetivo das micelas dependerem criticamente das condições da separação, a reprodutibilidade do tempo de migração exige um controle cuidadoso das condições experimentais. Comparativamente a outras técnicas eletroforéticas, a CEM possui uma baixa capacidade de picos, o que limita seu uso a misturas não muito complexas. Isto está diretamente relacionado ao fato da fase secundária (micelas) estar em movimento e, conseqüentemente, todos os solutos, mesmo os totalmente retidos pela micela, serem eluídos, limitando o tempo em que a separação deve ocorrer a um intervalo característico (Figura 9) [30].

Figura 9 – Intervalo característico de eluição em CEM



Fonte: TAVARES, 1997 [30].

De acordo com a Figura 9, os solutos só podem eluir entre os tempos t_0 (soluto não-retido pela micela, ou simplesmente um soluto neutro, que migra apenas por ação do fluxo eletrosmótico), e t_{mc} (tempo de migração da micela). Assim, o fator t_0/t_{mc} expressa convenientemente o intervalo útil de separação em CEM [30].

1.2.2.2 Causas de alargamento de bandas

Existem algumas particularidades em CEM, como também processos distintos, que contribuem para a dispersão das zonas. Por exemplo, a variância da zona resultante de difusão longitudinal é proporcional ao coeficiente de difusão do soluto e ao tempo de

migração. Em CEM, esta contribuição depende não somente da difusão do soluto na fase móvel, como também de sua difusão na fase micelar. Adicionalmente, os solutos que apresentam altos valores de k' despendem muito tempo no interior da micela, que por sua vez migra lentamente. Assim sendo, tais solutos requerem mais tempo para eluir do capilar e as bandas são mais vulneráveis ao alargamento gerado por difusão [30].

1.2.3 Análise do nelfinavir por EC

Alguns métodos de análise do mesilato de nelfinavir por EC descritos na literatura serão abordadas resumidamente a seguir.

Chelyapov e colaboradores [23] desenvolveram um método rápido, barato e quantitativo para a determinação de inibidores de protease no soro, entre eles o mesilato de nelfinavir, utilizando condições comuns para o isolamento e análise. O melhor procedimento de separação desenvolvido envolveu capilar de sílica fundida e uma solução tampão contendo ácido fórmico e acetonitrila. Este procedimento permitiu a análise de três fármacos em 15 min. Os fármacos foram isoladas a partir de soros de pacientes com uma mistura de acetato de etila e hexano. A sensibilidade do método desenvolvido por EC foi suficiente para a detecção dos agentes farmacológicos com as menores concentrações clinicamente relevantes ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Gutleben e colaboradores [24] mostraram um método por EC para a separação simultânea de fármacos utilizados na TARV, entre eles o mesilato de nelfinavir, no soro de pacientes. Como os fármacos investigados possuem grupos amino básicos, o sistema de eletrólito usado foi um tampão ácido. A fim de estabelecer um FEO catódico forte, um surfactante polianiônico foi adicionado ao eletrólito de corrida. Assim, foram obtidos rápidos tempos de migração devido a uma migração codirecional dos analitos e ao FEO. O sistema de separação desenvolvido exibiu boa seletividade para os compostos investigados e sensibilidade suficiente para monitorar os níveis do fármaco em pacientes tratados com TARV, com detecção a 185 nm.

Tavares e colaboradores [25] descreveram por EC a análise simultânea de fármacos do coquetel de drogas anti-AIDS, distribuído pelo programa DST-AIDS do governo

brasileiro, entre os quais: didanosina, zalcitabina, nevirapina, lamivudina, ritonavir, indinavir, saquinavir e nelfinavir. O método desenvolvido para análise de medicamentos contendo os fármacos utilizou eletrólito de corrida composto por HCl 20 mmol L⁻¹ em metanol:acetonitrila 1:1 (v/v), contendo SDS 10 mmol L⁻¹; injeção 3 s x 2,0 kPa, +25 kV, com detecção a 200 nm.

Pereira e colaboradores [26] desenvolveram um método simples e rápido por EC para a separação simultânea de diferentes fármacos: nevirapina, indinavir, ritonavir, saquinavir, estavudina, zidovudina, nelfinavir, efavirenz e didanosina. As análises foram realizadas em um capilar de sílica fundida utilizando um tampão de corrida constituído por tetraborato de sódio 10 mmol L⁻¹, SDS 20 mmol L⁻¹, 30% de acetonitrila e 5% de etanol. Todos os analitos foram separados dentro de 10 min, sob uma tensão de +20 kV. O método proposto foi validado para zidovudina, didanosina e efavirenz em soro humano, com detecção a 200 nm.

Dentro deste contexto, é importante ressaltar que não foram encontrados na literatura, até o momento, métodos capazes de analisar, simultaneamente, o mesilato de nelfinavir e as mesmas impurezas descritas neste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

No presente estudo foi proposto o desenvolvimento de um método para a determinação do mesilato de nelfinavir e suas impurezas utilizando a CEM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimização da composição do eletrólito de corrida utilizando planejamento de experimentos e avaliação dos demais parâmetros instrumentais inerentes à técnica;
- Validação do método proposto em conformidade com os requisitos da Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 [38] e do “International Conference Harmonization” [39].
- Utilização do Teste de Youden [40,41] para a realização da figura de mérito robustez com a finalidade de avaliar o efeito da variação dos parâmetros analíticos no método proposto.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes e padrões analíticos

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Dodecil sulfato de sódio (SDS), tetraborato de sódio decahidratado e Sudan III foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Hidróxido de sódio (NaOH) foi adquirido da Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (São Paulo, Brasil). Metanol foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e da Dinâmica Química Contemporânea Ltda (São Paulo, Brasil). Os padrões e amostra de comprimidos foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos - Far Manguinhos (Rio de Janeiro, Brasil).

Soluções estoque de tampão tetraborato de sódio (TB) (pH 9,24; 100 mmol L⁻¹) e de SDS (100 mmol L⁻¹) foram utilizadas para o preparo dos eletrólitos.

Soluções estoque dos padrões (1000 mg L⁻¹) foram preparadas separadamente em metanol (MeOH). Estas soluções foram armazenadas no freezer até o momento do ensaio e preparadas de acordo com a necessidade de cada procedimento experimental.

3.1.2 Instrumentação

Os experimentos foram realizados em equipamento comercial de EC (CE-7100, Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), fixado em 200 nm, dispositivo de controle de temperatura, mantida a 20°C, e programa para controle, aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, A.06.01 ref). As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (50 mbar 3 s) e o sistema de eletroforese foi operado sob condições de polaridade normal e tensão constante (+20 kV). A taxa de aquisição do sinal de detecção foi fixada em 5 Hz. Em todos os experimentos, um capilar de sílica fundida

(Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA) de 48,5 cm de comprimento total, 40,0 cm de comprimento efetivo e 50 μm de d.i. foi utilizado.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparo do padrão

O método foi otimizado utilizando o mesmo nível de concentração para todos os compostos, após diluição das soluções estoques em MeOH.

Para o procedimento de validação, as concentrações foram ajustadas de modo que as impurezas representassem 0,5% da concentração do fármaco. Sendo assim, duas soluções foram utilizadas:

- 1 - Solução 1: contendo 100 mg L^{-1} da impureza A; 100 mg L^{-1} da impureza B; e 20000 mg L^{-1} de mesilato de nelfinavir, para a quantificação das impurezas;
- 2 - Solução 2: contendo 100 mg L^{-1} de mesilato de nelfinavir, para a quantificação do fármaco.

3.2.2 Preparo da amostra

Vinte comprimidos foram pesados e macerados até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Quantidade de pó, correspondendo a 40 mg de mesilato de nelfinavir (conforme o valor declarado pelo fabricante), foi pesado e dissolvido com MeOH em um balão volumétrico de 2 mL. Após 10 min de sonicação, a solução foi filtrada em um filtro Millipore de 0,45 μm . Para a determinação dos analitos de interesse, duas soluções foram injetadas:

- 1 - Para a quantificação das impurezas: a solução filtrada, com concentração final igual a 20000 mg L^{-1} de mesilato de nelfinavir;
- 2 - Para a quantificação do fármaco: 25 μL da solução filtrada foram transferidos para um balão volumétrico de 5 mL e diluídos com MeOH, obtendo concentração final igual a 100 mg L^{-1} de mesilato de nelfinavir.

3.2.3 Procedimentos analíticos

As lavagens de condicionamento inicial do capilar, com pressão de aproximadamente 940 mbar, foram realizadas diariamente com solução de NaOH (1 mol L^{-1}) (30 min), água purificada (15 min) e solução de eletrólito de corrida (15 min). No intervalo entre corridas, foi realizado o reabastecimento dos “vials” contendo solução de eletrólito de corrida e o capilar foi condicionado com solução de NaOH ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) (2 min), água purificada (2 min) e solução de eletrólito de corrida (3 min). Ao término das análises, a limpeza do capilar foi realizada com solução de NaOH (1 mol L^{-1}) (5 min) e água purificada (5 min).

3.2.4 Curva de calibração externa

As curvas de calibração, em triplicata, foram preparadas para os analitos diluindo suas soluções estoque em MeOH. Os níveis das curvas de calibração foram: 80; 90; 100; 110 e 120 mg L^{-1} .

3.2.5 Razão do tempo de migração (t_0 / t_{mc})

Um marcador de fluxo (MeOH) foi injetado, a fim de se obter t_0 , e um marcador neutro (Sudan III) foi injetado, a fim de se obter t_{mc} , durante a realização do Teste de Youden.

3.3 PRODUÇÃO, MINIMIZAÇÃO E DISPOSIÇÃO FINAL DE RESÍDUOS

Dentre as vantagens da EC, destaca-se o baixo consumo de solventes. Os solventes orgânicos gerados foram segregados e acondicionados em bombonas plásticas estanques e rotuladas para futura reciclagem em destilador industrial presente em um dos

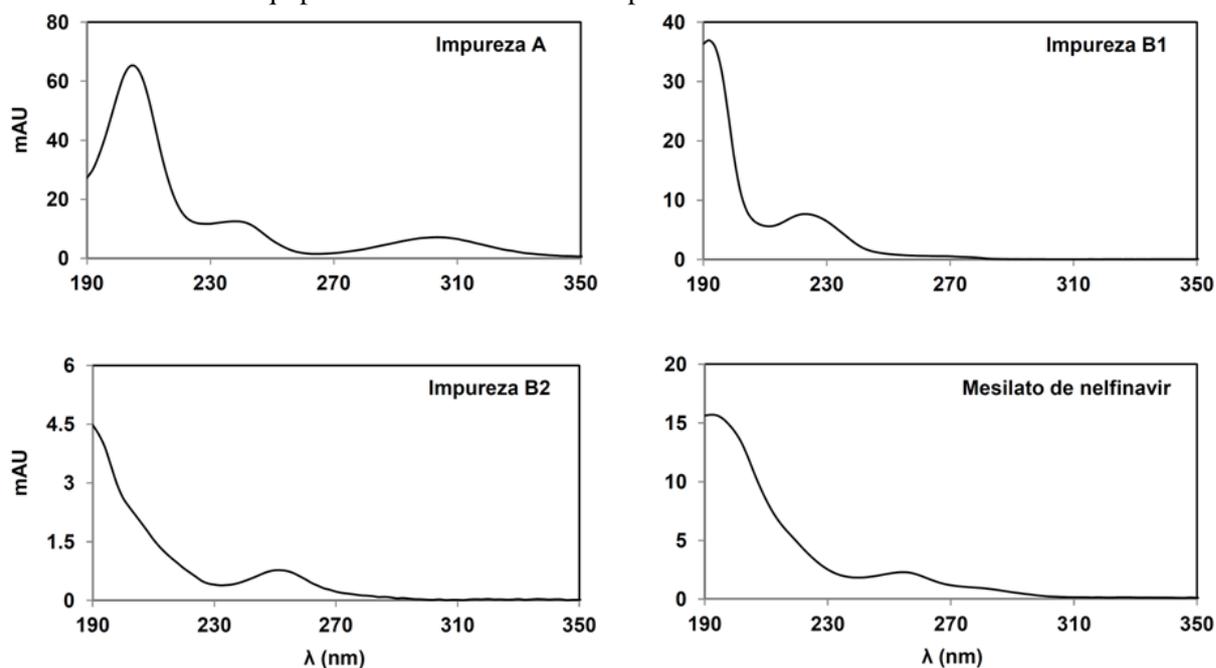
laboratórios de química da UFJF, com a finalidade de reutilização. Os resíduos foram armazenados em local apropriado, presente na instituição, para posteriormente serem coletados por uma empresa licenciada e especializada em tratar e dispor adequadamente resíduos de natureza química, adotando critérios e normas especificadas pelos órgãos ambientais, garantido assim a preservação do meio ambiente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA

A seleção do comprimento de onda foi baseada no espectro eletrônico de cada analito (Figura 10), dissolvido em MeOH até a concentração de 250 mg L^{-1} e injetados no equipamento de Eletroforese Capilar utilizando as condições otimizadas. A seleção de 200 nm considerou as seguintes características: comprimento de onda de maior absorvidade molar e estabilidade da linha de base presente nos eletroferogramas. Os espectros foram obtidos a partir dos sinais do detector DAD no equipamento de EC.

Figura 10 – Espectros eletrônicos do mesilato de nelfinavir e das impurezas A, B1 e B2 obtidos no equipamento de Eletroforese Capilar através do detector DAD

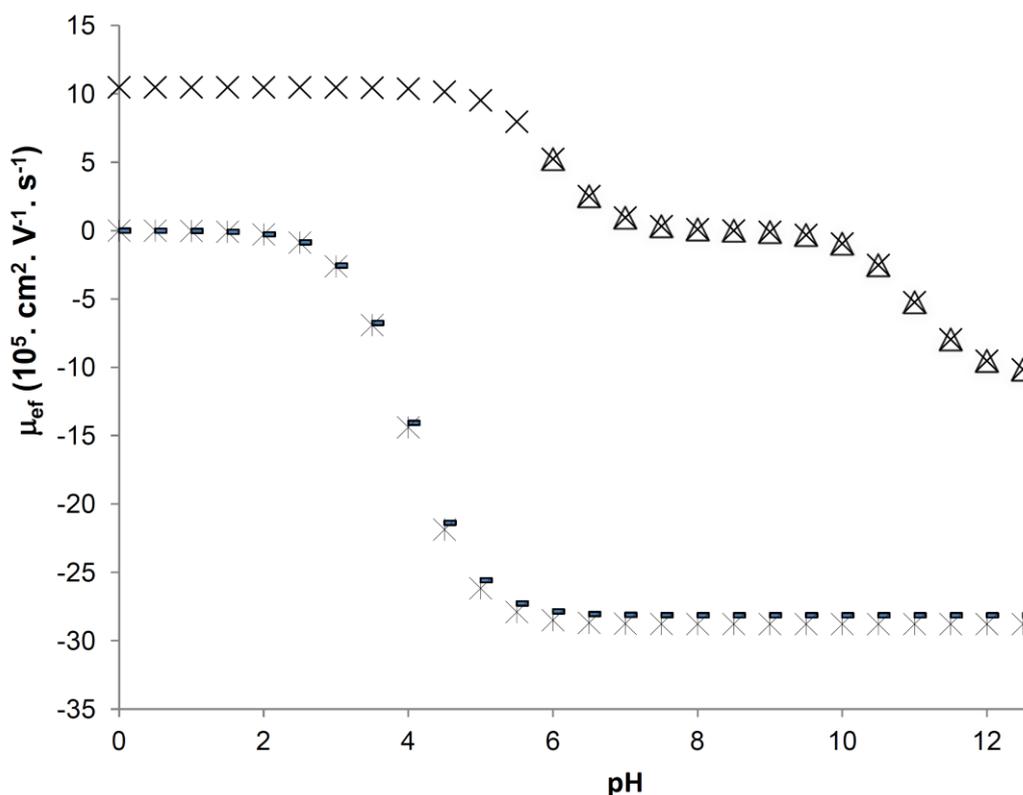


Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

4.2 ESTUDO PRELIMINAR

Para propor inicialmente um método por EC, a curva de mobilidade efetiva (μ_{ef}) de cada composto sob investigação pode sinalizar, com boa aproximação, as possibilidades a serem investigadas no processo de desenvolvimento do novo método. Esta curva fornece a mobilidade dos analitos em função do pH. Em outras palavras, é possível selecionar teoricamente o intervalo de pH no qual pode-se obter a separação dos compostos de interesse, quando as mobilidades dos analitos forem distintas. Assim, no presente caso, através da curva de μ_{ef} apresentada na Figura 11, é possível observar que a separação simultânea de mesilato de nelfinavir, impurezas A, B1 e B2 seria muito difícil de se obter utilizando a ECZ convencional, uma vez que cada analito possui mobilidade muito semelhante com, pelo menos, um dos outros compostos. Dentro deste contexto, devido ao comportamento dos analitos de interesse, a cromatografia electrocinética micelar (CEM) foi selecionada como a técnica a ser investigada.

Figura 11 – Curvas de mobilidade efetiva de mesilato de nelfinavir (x), impureza A (-), impureza B1 (*), e impureza B2 (Δ)



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

De modo a realizar uma investigação preliminar, eletrólito (BGE) consistindo de TB (pH 9,24; 25 mmol L⁻¹) e SDS (25 mmol L⁻¹) e diluição dos analitos em MeOH foram inicialmente testados. As concentrações inicialmente testadas para o preparo do BGE levaram em consideração a necessidade de se evitar a formação de bolhas (no caso de alta concentração de SDS) e corrente elevada (devido à concentração de TB). A partir dos eletroferogramas individuais obtidos, a resposta monitorada foi a mobilidade eletroforética (μ_{ep}) de cada composto de interesse (Tabela 2).

Tabela 2 – Mobilidade eletroforética (μ_{ep}) dos compostos de interesse nas condições experimentais iniciais

Composto de interesse	$\mu_{ep} \times 10^5$ (cm² V⁻¹ s⁻¹)
Nelfinavir	-36,6
Impureza A	-25,6
Impureza B1	-25,9
Impureza B2	-36,6

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Pela Tabela 2, pode-se constatar que as impurezas A e B1 apresentaram mobilidades eletroforéticas similares, enquanto o mesilato de nelfinavir e a impureza B2 apresentaram mesma μ_{ep} nas condições inicialmente testadas. Devido aos complexos mecanismos e variáveis envolvidos nas separações por CEM, o planejamento de experimentos sinaliza como uma ferramenta interessante para a otimização das condições de separação em comparação com métodos univariados [42].

Deste modo, a fim de investigar a separação simultânea destes compostos por CEM, a abordagem de um planejamento de experimentos foi considerada. Assim, as variáveis TB, SDS e MeOH foram avaliadas através de um planejamento fatorial misto (PFM), com a finalidade de otimizar a composição do BGE capaz de assegurar a separação simultânea do mesilato de nelfinavir e das impurezas A, B1 e B2. PFM, apesar de ser pouco utilizado, pode ser muito interessante, pois permite a seleção de uma gama de níveis diferentes, aumentando assim a informação experimental obtida. No presente caso, foi necessária a utilização de um PFM, porque o número de níveis para cada fator era diferente, ou seja, 2, 5 e 3 para TB, SDS

e MeOH, respectivamente, resultando em um PFM do tipo 2x5x3, e totalizando 30 experimentos. É importante lembrar que os valores de nível utilizados foram baseados na investigação preliminar. Vários aspectos da seleção de fatores podem ser destacados: TB é normalmente selecionado como o tampão de escolha na abordagem por CEM, uma vez que resulta em um pH aproximadamente igual a 9, o que é uma estratégia de separação interessante, por promover um FEO elevado, aumentar a eficiência e diminuir o tempo de análise; SDS é um surfactante aniônico comumente utilizado em CEM e, em geral, nas separações farmacêuticas fornece bons resultados; finalmente, a adição de solventes orgânicos altera a viscosidade e a constante dielétrica do BGE, resultando numa variação do fluxo eletrosmóticos [30]. Outras condições operacionais, tais como tempo de injeção, comprimento de onda, temperatura do cartucho e voltagem aplicada, foram mantidas fixas, conforme descrito na parte experimental. A matriz codificada é apresentada na Tabela 3, com os fatores e níveis utilizados para realização dos experimentos.

Tabela 3 – Matriz do planejamento fatorial misto contendo fatores e níveis

Experimentos	X ₁	X ₂	X ₃	Experimentos	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1	16	1	-1	-1
2	-1	-0,5	-1	17	1	-0,5	-1
3	-1	0	-1	18	1	0	-1
4	-1	0,5	-1	19	1	0,5	-1
5	-1	1	-1	20	1	1	-1
6	-1	-1	0	21	1	-1	0
7	-1	-0,5	0	22	1	-0,5	0
8	-1	0	0	23	1	0	0
9	-1	0,5	0	24	1	0,5	0
10	-1	1	0	25	1	1	0
11	-1	-1	1	26	1	-1	1
12	-1	-0,5	1	27	1	-0,5	1
13	-1	0	1	28	1	0	1
14	-1	0,5	1	29	1	0,5	1
15	-1	1	1	30	1	1	1

X₁. TB (mmol L⁻¹): (-1) 15; (1) 25

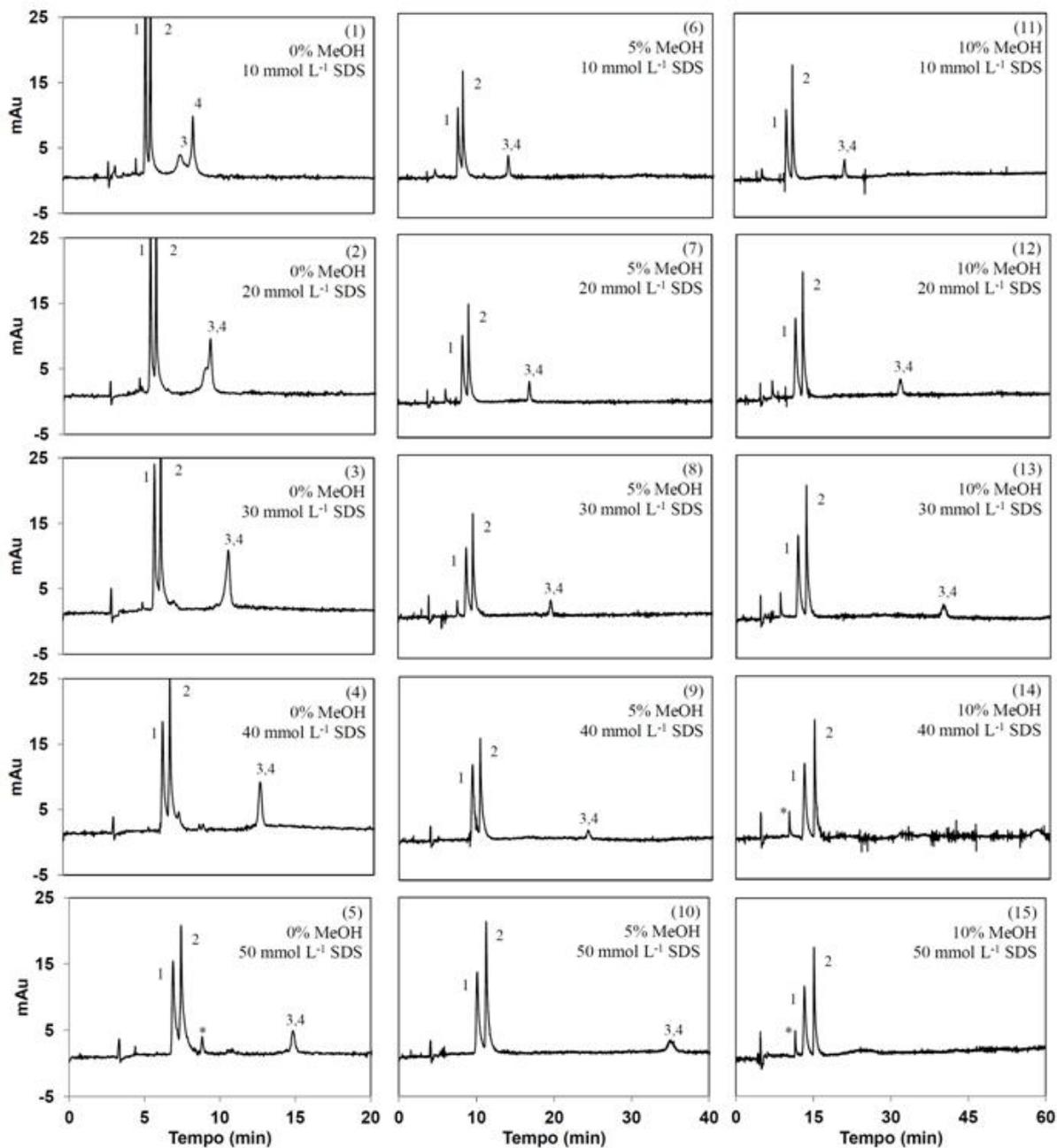
X₂. SDS (mmol L⁻¹): (-1) 10; (-0,5) 20; (0) 30; (0,5) 40; (1) 50

X₃. MeOH (% v/v): (-1) 0; (0) 5; (1) 10

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

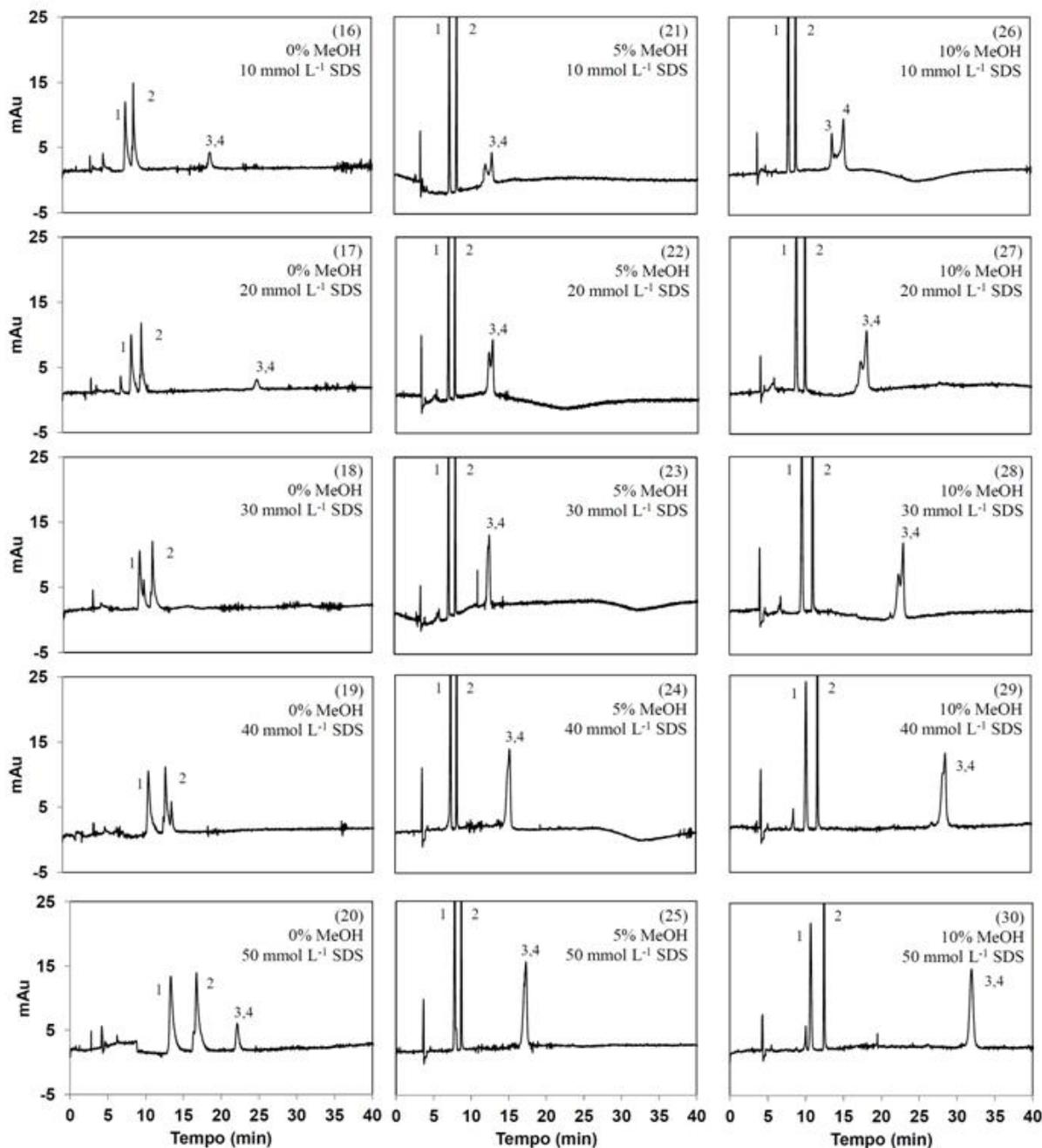
Os experimentos foram realizados de forma aleatória e os eletroferogramas obtidos estão apresentados nas Figuras 12 e 13.

Figura 12 – Eletroferograma da mistura de padrões: (1) Impureza A (2) Impureza B1 (3) Impureza B2 (4) Mesilato de nelfinavir. Condições experimentais: eletrólito, TB (pH 9,24; 15 mmol L⁻¹); temperatura do cartucho, 20°C; injeção, 50 mbar 3 s; voltagem, +20 kV; λ , 200 nm; capilar, 50 μ m x 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo)



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Figura 13 – Eletroferograma da mistura de padrões: (1) Impureza A (2) Impureza B1 (3) Impureza B2 (4) Mesilato de nelfinavir. Condições experimentais descritas na Figura 12



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

O intervalo limitado dos tempos de eluição em CEM altera a expressão para a resolução [30]. Sendo assim, de acordo com Nishi e Terabe [43], em CEM a resolução (R_s) é dada por:

$$R_s = \frac{N^{1/2}}{4} \frac{(\alpha - 1)}{(\alpha)} \frac{(k'_2)}{(1 + k'_2)} \frac{(1 - t_0/t_{mc})}{(1 + (t_0/t_{mc})k'_1)} \quad (20)$$

Onde $\alpha = k'_2/k'_1$ é o fator de separação e N é o número de pratos teóricos.

Para analitos neutros, o tempo de migração (t_m) está limitado entre o tempo de migração do fluxo eletrosmótico (t_0) e aquele da micela (t_{mc}), e o fator de capacidade k' do analito pode ser calculado por:

$$k' = \frac{t_m - t_0}{t_0 (1 - t_m/t_{mc})} \quad (21)$$

Por outro lado, o fator de capacidade k' para um analito ácido e uma micela aniônica, onde o pareamento iônico entre os dois é ausente, é dado por:

$$k' = \frac{\mu_{ep,S*} - \mu_{ep,S}}{\mu_{ep,mc} - \mu_{ep,S*}} \quad (22)$$

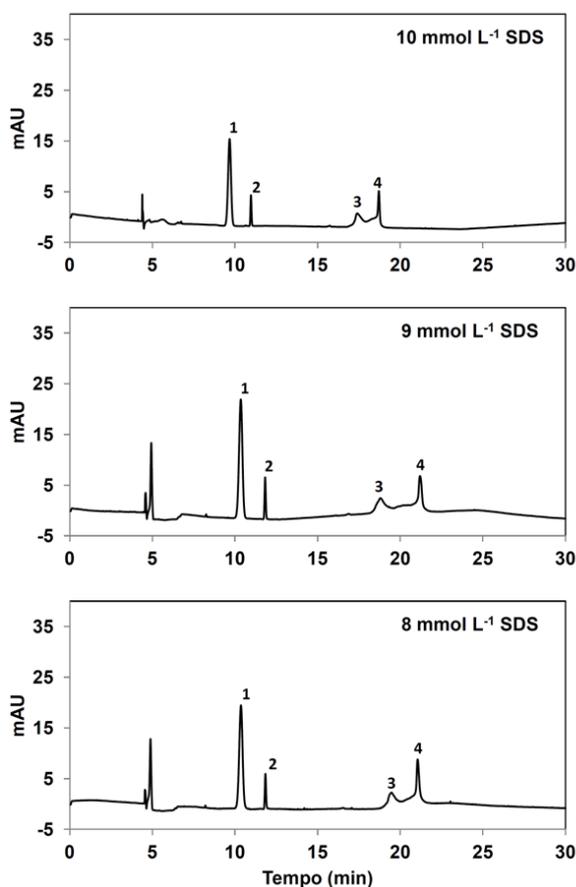
Onde $\mu_{ep,S}$ é a mobilidade eletroforética do analito na ausência da micela e $\mu_{ep,S*}$ é a mobilidade eletroforética do analito na presença da micela.

Sendo assim, para avaliar os dois pares críticos de picos quantitativamente (o primeiro par consistindo dos analitos ácidos e o segundo par consistindo dos analitos neutros), rigorosamente, seria necessário injetar um marcador de fluxo, como MeOH, para cada um dos 30 experimentos, em ordem de obter t_0 , e um marcador neutro, como Sudan III, em ordem de obter t_{mc} . Além do mais, seria necessário também repetir os 30 experimentos usando eletrólitos sem a micela, em ordem de obter $\mu_{ep,S}$. Portanto, levando em consideração a discussão, um total de noventa experimentos seriam necessários para obter a informação necessária para calcular a resolução. Uma vez que o objetivo com o planejamento experimental é o de obter as melhores condições com um reduzido número de experimentos, optou-se por realizar uma avaliação qualitativa do perfil de separação, a partir do planejamento experimental, usando somente os 30 experimentos.

Assim, os 30 eletroferogramas obtidos foram separados em dois grupos de experimentos: um realizado com 15 mmol L⁻¹ de TB (Figura 12) e o outro realizado com 25 mmol L⁻¹ de TB (Figura 13). Levando em consideração o primeiro grupo (experimentos 1 a 15), o perfil de separação do par crítico de picos 1 e 2 praticamente não se alterou quando a concentração de MeOH foi fixada em cada um dos três níveis, independente da concentração

de SDS. Por outro lado, o par crítico de picos 3 e 4 apenas sinalizou um início de separação no experimento 1, que utilizou 0% de MeOH e 10 mmol L⁻¹ de SDS. Tendo em conta o segundo grupo (experimentos 16 a 30), embora o par crítico de picos 1 e 2 tenha apresentado separação aceitável em todos os experimentos, o par crítico de picos 3 e 4 apresentou coeluição total ou parcial. É importante observar que uma melhora no perfil de separação entre os picos 3 e 4 ocorreu quando a concentração de MeOH foi fixada a um nível elevado (10%) e a concentração de SDS foi diminuída (experimentos 30, 29, 28, 27 e 26). Deste modo, um teste univariado foi realizado, a fim de avaliar as concentrações de SDS em níveis inferiores a 10 mmol L⁻¹, isto é, 9 e 8 mmol L⁻¹. Considerando que em uma amostra real a concentração do mesilato de nelfinavir, pico 4, estará presente numa concentração 200 vezes maior em comparação com a impureza B2, o pico 3, o melhor perfil de separação observado utilizou 9 mmol L⁻¹ de SDS no BGE como apresentado na Figura 14.

Figura 14 – Eletroferograma da mistura de padrões: 100 mg L⁻¹ (1) Impureza A (2) Impureza B1 (3) Impureza B2 (4) Mesilato de nelfinavir. Condições experimentais: eletrólito, TB (pH 9,24; 25 mmol L⁻¹) e MeOH (10%, v/v); temperatura do cartucho, 20°C; injeção, 50 mbar 3 s; voltagem, +20 kV; λ, 200 nm; capilar, 50 μm x 48,5 cm (40,0 cm comprimento efetivo)

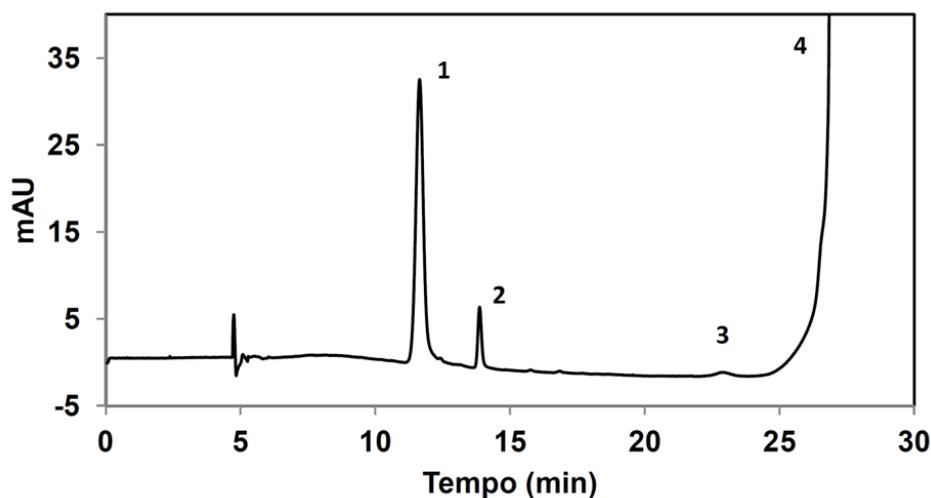


Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Foi realizado um teste diluindo as soluções padrão em SDS (9 mmol L^{-1}), mas o mesilato de nelfinavir (pico 4) e a impureza B2 (pico 3) coeluíram novamente, mostrando que a interação entre ambos os analitos e o SDS deve acontecer apenas durante a corrida, caso contrário, a separação é prejudicada. Um outro teste foi realizado com uma maior concentração de MeOH no eletrólito, o qual apresentou um melhor perfil de separação entre os picos 3 e 4, mas causou um considerável aumento no ruído da linha de base.

Nos presentes eletroferogramas, o pico relacionado ao nelfinavir apresentou uma forma distorcida. Embora a adição de MeOH pareça aumentar o alargamento deste pico, sua adição é necessária para obter uma separação entre os picos 3 e 4. Assim, a fim de melhorar o distúrbio da linha de base apresentado pelo pico 4 e diminuir o tempo de análise, exaustivos testes foram realizados, variando a voltagem, o tempo de injeção, aumentando a temperatura ou diminuindo o comprimento do capilar. Somente nas condições descritas na Figura 14, foi possível obter uma separação aceitável entre os picos 3 e 4, com uma frequência analítica de duas amostras por hora. No entanto, é importante salientar que o comportamento da linha de base não se mostrou crítico para a quantificação do analito na amostra real, como será demonstrado na seção de validação. Finalmente, antes dos procedimentos de validação, a concentração final dos analitos foi alterada, de modo que as impurezas representassem 0,5% da concentração do fármaco (Figura 15).

Figura 15 – Eletroferograma da mistura de padrões contendo 100 mg L^{-1} das impurezas A e B; e 20000 mg L^{-1} do mesilato de nelfinavir: (1) Impureza A (2) Impureza B1 (3) Impureza B2 (4) Mesilato de nelfinavir. Condições experimentais: eletrólito, TB ($\text{pH } 9,24$; 25 mmol L^{-1}), SDS (9 mmol L^{-1}) e MeOH (10%, v/v); temperatura do cartucho, 20°C ; injeção, 50 mbar 3 s; voltagem, +20 kV; λ , 200 nm; capilar, $50 \mu\text{m} \times 48,5 \text{ cm}$ (40,0 cm de comprimento efetivo)



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

4.3 PROCEDIMENTOS DE VALIDAÇÃO

Após a otimização das condições eletroforéticas, alguns dos parâmetros de validação, como seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e robustez, foram determinados de acordo com a Resolução RE n° 899 da ANVISA, de 29/05/2003 [38], e com o ICH [39].

4.3.1 Seletividade e linearidade

A seletividade do método foi avaliada pelo teste de pureza do pico usando o DAD. O pico eletroforético de cada analito não foi atribuído a mais de um componente [38,39].

O teste de linearidade foi conduzido através da construção de três curvas de calibração, a fim de avaliar a relação linear entre as concentrações dos analitos e as respectivas áreas obtidas. Os dados de cada intervalo de concentração, após tratamento utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários, foram avaliados estatisticamente levando em consideração a homocedasticidade (teste de Cochran), a normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e o teste de falta de ajuste (ANOVA) (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados obtidos do estudo de linearidade

	Coefficiente angular	Intercepto	ANOVA ^a	Normalidade dos resíduos ^b	Homoscedasticidade ^c
Mesilato de nelfinavir	1,04 (±0,0337)	1,78 (±3,41)	0,848	0,610	0,356
Impureza A	7,15 (±0,0985)	-5,01 (±9,95)	0,752	0,623	0,371
Impureza B1	0,679 (±0,0221)	0,627 (±2,23)	0,111	0,783	0,405
Impureza B2	0,809 (±0,0266)	-2,37 (±2,69)	0,192	0,394	0,376

n = 3 (réplicas autênticas).

Intervalo (mg L⁻¹): 80 - 120.

^a ANOVA *p*-valor, nível de significância *p* < 0,05.

^b Teste de normalidade do resíduo (Teste de Shapiro-Wilk), nível de significância *p* < 0,05.

^c Teste de homogeneidade do resíduo (Teste de Cochran), valor crítico = 0,684, nível de significância de 0,05.

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

4.3.2 Precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A precisão pode ser determinada pela estimativa do desvio padrão relativo (DPR) [38]. A precisão na validação deste método otimizado foi efetuada ao nível da repetibilidade. A repetibilidade (n = 3) na área da amostra foi realizada para 80, 90, 100, 110 e 120% da concentração teste. No presente caso, foram usadas concentrações de 80, 90, 100, 110 e 120 mg L⁻¹ de mesilato de nelfinavir e das impurezas. Todos os resultados apresentaram valores de precisão aceitáveis (não superiores a 5%), como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – DPR (%) obtidos da repetibilidade e valores de LD e LQ (mg L^{-1})

	Mesilato de nelfinavir	Impureza A	Impureza B1	Impureza B2
Repetibilidade	2,82*	1,13*	2,33*	1,96*
	3,89**	1,71**	1,14**	3,68**
LD	14,7	12,8	8,03	18,7
LQ	49,0	42,6	26,8	62,3

* Concentração real, ** Tempo de migração

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados com base no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva [38] e ambos apresentaram valores aceitáveis conforme mostrado na Tabela 5.

4.3.3 Exatidão

A exatidão, no presente caso, foi calculada como a porcentagem de recuperação obtida por meio da determinação de uma quantidade conhecida de analito adicionado na amostra em cinco níveis de concentração: 80, 90, 100, 110 e 120 mg L^{-1} [38,39]. Os resultados obtidos mostraram que o método apresenta uma exatidão aceitável dentro de um intervalo de confiança de 95%.

4.3.4 Robustez

A robustez foi realizada utilizando o Teste de Youden [40,41]. Sendo assim, sete parâmetros analíticos foram selecionados e pequenas variações foram induzidas nos valores nominais do método (Tabela 6).

Tabela 6 – Parâmetros analíticos e variações para avaliação da robustez

Parâmetros	Condição nominal		Variação	
Concentração do tampão (mmol L ⁻¹)	25	A	23	a
Concentração de SDS no eletrólito (mmol L ⁻¹)	9	B	11	b
Concentração de MeOH no eletrólito (% , v/v)	10	C	8	c
Temperatura do cartucho (°C)	20	D	22	d
Condições de voltagem (kV)	20	E	18	e
Condições de injeção (s)	3	F	4	f
Fornecedor de MeOH	X	G	Y	g

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

As condições analíticas para os valores nominais são representadas por letras maiúsculas e as condições com a pequena variação são representadas por letras minúsculas. Os sete parâmetros e as respectivas variações foram combinados em oito ensaios ou corridas eletroforéticas, realizados em uma ordem aleatória. Na Tabela 7 é demonstrada a combinação fatorial dos parâmetros para o Teste de Youden.

Tabela 7 – Combinação fatorial dos parâmetros analíticos para avaliação da robustez pelo Teste de Youden

Parâmetro analítico	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentração do tampão	A	A	A	A	a	a	a	a
Concentração de SDS	B	B	b	b	B	B	b	b
Concentração de MeOH	C	c	C	c	C	c	C	c
Temperatura do cartucho	D	D	d	d	d	d	D	D
Condições de voltagem	E	e	E	e	e	E	e	E
Condições de injeção	F	f	f	F	F	f	f	F
Fornecedor de MeOH	G	g	g	G	g	G	G	g
<i>Resultado</i>	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Os resultados das análises são mostrados por letras de s a z. Assim, quando a combinação 1 foi utilizada, o resultado obtido foi s. Quando a combinação 2 foi usada, o

resultado obtido foi o t , e assim por diante. Os resultados obtidos nos oito corridas são demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados obtidos nas oito condições realizadas para avaliação da robustez

Condição	Tempos de migração (min)				Fator de separação	
	t_{m1}	t_{m2}	t_{m3}	t_{m4}	t_0 / t_{mc}	$\alpha_{3,4}$
1	9,96	11,5	18,2	22,3	0,187	3,92
2	9,86	11,3	15,1	20,6	0,173	2,77
3	9,48	10,9	14,1	21,1	0,153	3,38
4	9,80	11,1	16,6	20,5	0,210	4,65
5	10,6	12,1	17,3	22,2	0,206	5,93
6	8,07	9,05	10,9	15,8	0,235	8,27
7	10,8	12,4	16,1	23,0	0,205	8,43
8	8,87	10,0	14,4	17,7	0,225	4,90

Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Na Tabela 8, além dos tempos de migração, também é possível observar o fator de separação (α). Para avaliar o efeito de cada um dos parâmetros na Tabela 6, a média dos quatro valores que correspondem às condições alteradas foi subtraída da média dos quatro valores obtidos em função das condições nominais. Os efeitos das variações dos parâmetros nos resultados das análises são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Efeitos dos parâmetros analíticos no tempo de migração (min), na razão do tempo de migração (t_0/t_{mc}) e no fator de separação (α) do método proposto

Efeito	t_{m4}^*	t_0 / t_{mc}^*	$\alpha_{3,4}^*$
Concentração do tampão (mmol L^{-1}); (A = 25; a = 23)	1,45	-0,037	-3,20
Concentração de SDS (mmol L^{-1}); (B = 9; b = 11)	-0,382	0,002	-0,116
Concentração de MeOH (%); (C = 10; c = 8)	3,51	-0,023	0,269
Temperatura do cartucho ($^{\circ}\text{C}$); (D = 20; d = 22)	1,00	-0,004	-0,553
Condições de voltagem (kV); (E = 20; e = 18)	-2,35	0,002	-0,325
Condições de injeção (s); (F = 3; f = 4)	0,532	0,016	-0,859
Fornecedor de MeOH; (G = X; g = Y)	-0,021	0,020	2,07

*Média dos valores obtidos nas condições nominais – média dos valores obtidos nas condições alteradas.

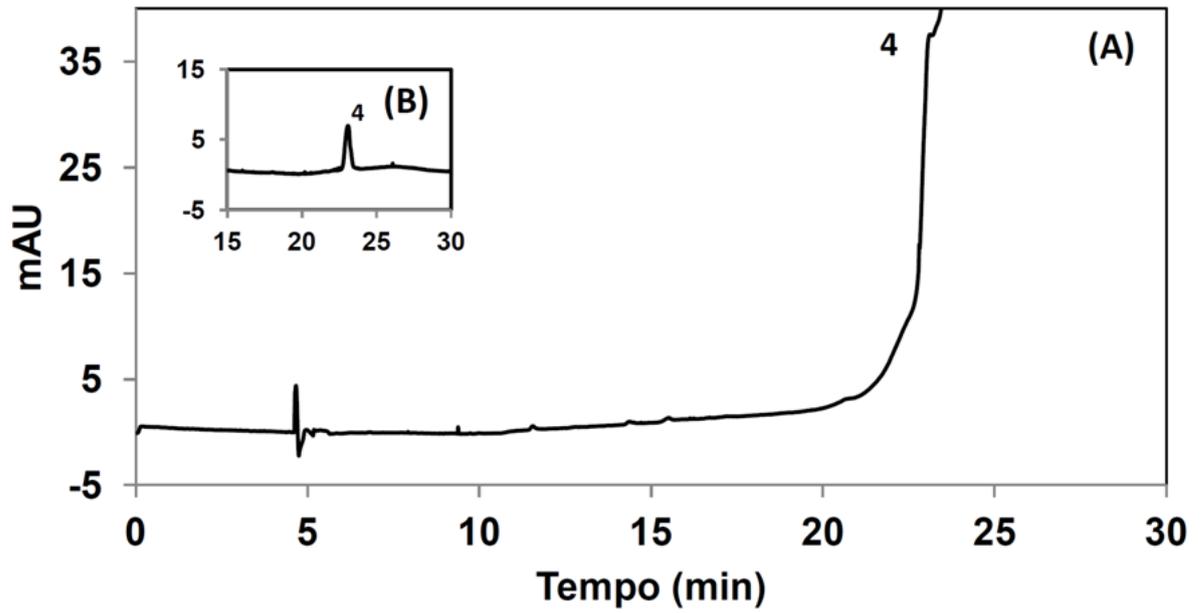
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

O tempo de migração do último pico (t_{m4}) foi consideravelmente mais influenciado por um parâmetro analítico. Ou seja, um decréscimo de 2% (v/v) na concentração de MeOH no BGE induziu uma redução média de 3,51 min em t_{m4} . Já a razão do tempo de migração, t_0/t_{mc} , está diretamente relacionada com o tamanho da janela de migração. Quanto menor o valor de t_0/t_{mc} , maior a janela de migração e, conseqüentemente, maior a resolução. É necessário reduzir a velocidade do FEO para obter um valor menor de t_0/t_{mc} . A adição de um solvente orgânico, tal como MeOH, é um método útil, no entanto, na prática, um longo tempo de corrida é requerido [43] e isto foi observado. O parâmetro analítico com o maior efeito sobre o valor de t_0/t_{mc} e sobre o fator de separação ($\alpha_{3,4}$) foi a concentração do tampão no eletrólito. Com uma redução de 2 mmol L⁻¹ na concentração do tampão, houve um aumento médio de 0,037 em t_0/t_{mc} e de 3,20 em $\alpha_{3,4}$. Alguns parâmetros, como a concentração de SDS, a temperatura do cartucho e as condições de injeção, exibiram pouca influência sobre os fatores avaliados do método eletroforético. Para o teste de robustez, a recuperação obtida permaneceu dentro do intervalo de 100 ± 5 %.

4.4 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA EM UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA (COMPRIMIDO)

Após avaliação dos parâmetros de validação, o método otimizado foi aplicado para o doseamento de uma formulação farmacêutica com um conteúdo declarado de 250 mg de mesilato de nelfinavir por comprimido, obtendo 239 mg ($\pm 1,26\%$) de mesilato de nelfinavir como resultado. Outros compostos não foram detectados (Figura 16).

Figura 16 – Eletroferograma da amostra: (A) contendo 20000 mg L⁻¹ de mesilato de nelfinavir (4); (B) contendo 100 mg L⁻¹ de mesilato de nelfinavir (4). Condições experimentais descritas na Figura 14



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

5 CONCLUSÃO

Um método capaz de analisar simultaneamente o fármaco mesilato de nelfinavir e duas impurezas provenientes de uma rota de síntese foi validado com uso da Cromatografia Eletrocínética Micelar;

O planejamento fatorial misto, ainda que pouco utilizado, demonstrou aplicação para a otimização do eletrólito;

A concentração do tampão, dentre os demais parâmetros avaliados, teve o maior efeito no fator de separação do par crítico de picos, o que foi demonstrado pelo Teste de Youden;

O método proposto pode ser útil para a determinação destes analitos em processos de monitoramento de síntese ou no controle da qualidade de insumos farmacêuticos e das formulações farmacêuticas;

O procedimento analítico oferece como vantagens, eficiência, limites de quantificação aceitáveis, baixo consumo de solventes, pequena demanda de amostras e utilização de colunas não dedicadas.

REFERÊNCIAS

- [1] SOUZA, M. V. N. D.; ALMEIDA, M. V. D. Drogas Anti-VIH: Passado, Presente e Perspectivas Futuras. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 366-372, 2003.
- [2] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais**: Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2014/56532/_p_manual_tecnico_hiv_2014_final_pdf_p__31450.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2014.
- [3] LAZZAROTTO, A. R.; DERESZ, L. F.; SPRINZ, E. HIV/AIDS e Treinamento Concorrente: a Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 149-154, mar./abr. 2010.
- [4] UNAIDS: Apresentação. Disponível em: <<http://www.unaids.org.br/antiores/relatorio.asp>>. Acesso em: 20 fev. 2014.
- [5] SILVA, G. R. D.; CONDESSA, F. A.; PIANETTI, G. A.; NUNAN, E. D. A.; CAMPOS, L. M. M. D. Desenvolvimento e Validação de Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Determinação Simultânea das Impurezas Timina e Timidina na Matéria-Prima Estavudina. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1686-1690, 2008.
- [6] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais**: Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo hiv em adultos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55308/protocolo_13_3_2014_pdf_28003.pdf>. Acesso em: 01 out. 2014.
- [7] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de DST e AIDS**: Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo hiv em crianças e adolescentes. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2014/55939/08_05_2014_protocolo_pediatico_pdf_36225.pdf>. Acesso em: 03 out. 2014.
- [8] VIRACEPT: **Patent expiration information**. Disponível em: <<http://www.drugpatentwatch.com/ultimate/preview/tradename/index.php?query=VIRACEPT>>. Acesso em: 02 nov. 2010.
- [9] ALBIZATI, K. K.; BABU, S.; BIRCHLER, A.; BUSSE, J. K.; FUGETT, M.; GRUBBS, A.; HADDACH, A.; PAGAN, M.; POTTS, B.; REMARCHUK, T.; RIEGER, D.; RODRIGUEZ, R.; SHANLEY, J.; SZENDROI, R.; TIBBETTS, T.; WHITTEN, K.; BORER, B. C. A synthesis of the HIV-protease inhibitor nelfinavir from d-tartaric acid. **Tetrahedron Letters**, Texas, v. 42, n. 37, p. 6481-6485, sept. 2001.

[10] FRITZ, J. E.; DRESSMAN, B. A.; KALDOR, S. W.; REICH, S. H.; KALISH, V. J. **Inibidores da Protease do HIV**. PI 1100166-6A, 07 mar. 1997, 23 fev. 1999.

[11] DRESSMAN, B. A.; FRITZ, J. E.; HAMMOND, M.; HORNBACK, W. J.; KALDOR, S. W.; KALISH, V. J.; MUNROE, J. E.; REICH, S. H.; TATLOCK, J. H.; SHEPHERD, T. A.; RODRIGUEZ, M. J. **Protease Inhibitors**. US 5,484,926, 02 fev. 1994, 16 jan. 1996.

[12] DRESSMAN, B. A.; FRITZ, J. E.; HAMMOND, M.; HORNBACK, W. J.; KALDOR, S. W.; KALISH, V. J.; MUNROE, J. E.; TATLOCK, J. H.; RODRIGUEZ, M. J.; JUNGHEIM, L. N. **HIV Protease Inhibitors**. WO 95/09843 (1995), 07 oct. 1994, 13 apr. 1995.

[13] HAMMOND, M.; FRITZ, J. E.; DRESSMAN, B. A.; HORNBACK, W. J.; KALDOR, S. W.; KALISH, V. J.; MUNROE, J. E.; REICH, S. H.; TATLOCK, J. H.; SHEPHERD, T. A.; RODRIGUEZ, M. J.; JUNGHEIM, L. N. **Inibidores da Protease do HIV**. PI 9407782-7A, 07 out. 1994, 21 out. 1998.

[14] BABU, S.; BORER, B. C.; REMARCHUK, T. P.; SZENDROI, R. J.; WHITTEN, K. R.; BUSSE, J. K.; ALBIZATI, K. F. **Methods of Making HIV-Protease Inhibitors and Intermediates for Making HIV-Protease Inhibitors**. US 6,117,999, 19 feb. 1999, 12 sept. 2000.

[15] ALBIZATI, K. F.; REICH, S. H.; VARNEY, M. D.; ZHANG, K. E.; KOBAYASHI, T. **HIV Protease Inhibitors**. US 6,001,851, 12 mar. 1998, 14 dec. 1999.

[16] WHITTEN, K.; DEASON, M. E. **Intermediates for Making HIV-Protease Inhibitors and Methods of Making HIV-Protease Inhibitors**. WO 98/09951, 05 sept. 1996, 12 mar. 1998.

[17] DEASON, M. E.; WHITTEN, K. **Intermediate Compounds Useful for Making HIV Protease Inhibitors such as Nelfinavir**. US 5,962,725, 05 sept. 1997, 05 oct. 1999.

[18] BABU, S.; BORER, B. C.; REMARCHUK, T. P.; SZENDROI, R. J.; WHITTEN, K. R.; BUSSE, J. K.; ALBIZATI, K. F. **Intermediates for Making HIV-Protease Inhibitors**. US 6,084,107, 05 sept. 1997, 04 July 2000.

[19] BABU, S.; BORER, B. C.; REMARCHUK, T. P.; SZENDROI, R. J.; WHITTEN, K. R.; BUSSE, J. K.; ALBIZATI, K. F. **Intermediates for Making HIV-Protease Inhibitors**. US 5,705,647, 05 sept. 1996, 06 jan. 1998.

[20] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diretoria Colegiada**: Dispõe sobre o registro de insumos farmacêuticos ativos (IFA) e dá outras providências – 2009: Resolução 57. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: <ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssp/bibliote/informe_eletronico/2009/iels.nov.09/iels214/U_RS-MS-ANVISA-RDC-57_171109.pdf>. Acesso em: 04 out. 2014.

- [21] SESHACHALAM, U.; RAJABABU, B.; HARIBABU, B.; HANDRASEKHAR, K. B. Novel Stability-Indicating RP-LC Method for the Determination of Nelfinavir Mesylate and its Related Impurities in Drug Substance and Pharmaceutical Formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Oxfordshire, v. 31, n. 3, p. 395-409, 2008.
- [22] JING, Q.; SHEN, Y.; TANG, Y.; REN, F.; YU, X.; HOU, Z. Determination of nelfinavir mesylate as bulk drug and in pharmaceutical dosage form by stability indicating HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 41, p. 1065-1069, mar. 2006.
- [23] CHELYAPOV, N.; JACOBS, S. A.; MAGEE, T. J. Determination of Human Immunodeficiency Virus-1 Protease Inhibitors in Patient Serum Using Free Solution Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 853, n. 1-2, p. 431-437, aug. 1999.
- [24] GUTLEBEN, W.; SCHERER K.; TUAN, N. D.; STOIBER, H.; DIERICH, M. P.; ZEMANN, A. Simultaneous separation of 11 protease and reverse transcriptase inhibitors for human immunodeficiency virus therapy by co-electroosmotic capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 982, p. 153-161, sept. 2002.
- [25] TAVARES, M. F. M.; JAGER, A. V.; SILVA, C. L. D.; MORAES, E. P.; PEREIRA, E. A.; LIMA, E. C. D.; FONSECA, F. N.; TONIN, F. G.; MICKE, G. A.; SANTOS, M. R.; OLIVEIRA, M. A. L. D.; MORAES, M. D. L. L. D.; KAMPEN, M. H. V.; FUJIYA, N. M. Applications of Capillary Electrophoresis to the Analysis of Compounds of Clinical, Forensic, Cosmetological, Environmental, Nutritional and Pharmaceutical Importance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 281-290, apr. 2003.
- [26] PEREIRA, E. A.; MICKE, G. A.; TAVARES, M. F. M. Determination of Antiretroviral Agents in Human Serum by Capillary Electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1091, n. 1-2, p. 169-176, aug. 2005.
- [27] ZHANG, H.; LIANG, F.; FENG, X.; ZHANG, H.; YUA, A.; FEI, Q. Determination of proteins in lactic acid bacterium drink and milk powder by micellar electrokinetic chromatography. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 6, p. 725-731, 2014.
- [28] MONZÓN, C. M.; VERA-CANDIOTI, L.; SARNO, M. D. C.; DELFINO, M. R. Fast and Efficient Monitoring of Diclofenac Dissolution Profile by CE. **Current Pharmaceutical Analysis**, Cambridge, v. 10, n. 1, p. 38-43, 2014.
- [29] DU, H.; CHEN, X. CD-MEKC Method to Analyze Triterpene Acids in Traditional Chinese Medicines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v.20, n. 7, p. 1268-1274, may 2009.

[30] TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

[31] VAZ, F. A. S. **Preparação de novas fases estacionárias monolíticas para uso em eletrocromatografia capilar**. 2011. Tese (Doutorado em Química)–Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

[32] BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

[33] WÄTZIG, H.; KAUPP, S.; GRAF, M. Inner surface properties of capillaries for electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, Tokyo, v. 22, n. 10, p. 588-604, oct. 2003.

[34] TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

[35] SILVA, J. A. F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.

[36] FARIA, A. F. **Desenvolvimento, otimização e validação de metodologia para análise de fluorquinolonas por eletroforese capilar**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química)–Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2006.

[37] HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

[38] BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, 02 de junho de 2003. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 17 abr. 2012.

[39] ICH Q2(R1) – International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Validation of analytical procedures, 2005. Disponível em:
<http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2014.

[40] INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos – DOQ-CGCRE-008, Revisão 4, julho de 2011. Disponível em:
<http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2014.

[41] CÉSAR, I. D. C.; PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 235-240, abr./jun. 2009.

[42] ORLANDINIA, S.; GOTTIB; R.; FURLANETTO, S. Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 87, p. 209-307, jan. 2014.

[43] NISHI, H.; TERABE, S.; J. Micellar electrokinetic chromatography Perspectives in drug analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 735, p. 3-27, may 1996.

APÊNDICE A – Material Suplementar.

A síntese e a caracterização dos padrões foram realizadas pela Far Manguinhos (Rio de Janeiro, Brasil) e estão descritas nesta seção.

Métodos

Geral

Os espectros de RMN foram registados utilizando um espectrômetro Bruker DRX (^1H a 400 MHz e ^{13}C a 100 MHz) em DMSO- d_6 ou em CDCl_3 ou em D_2O com TMS como padrão interno. As análises por Espectrometria de Massa de baixa resolução foram realizadas em um LC/MS Micromass ZMD, utilizando ionização por electrospray em modo de íons positivos ou negativos. As amostras foram introduzidas pelo método padrão de sonda de inserção direta.

O Nelfinavir foi sintetizado a partir do ácido *D*-tartárico como previamente descrito por Albizati e colaboradores [9].

Todos os compostos sintetizados exibiram satisfatórios ^1H RMN e Espectros de Massa. O espectro de dados observados para o mesilato de nelfinavir e as duas impurezas principais resultantes da sua via de síntese foram listados abaixo.

Ácido 3-hidroxi-2-metilbenzóico (impureza A):

(Disponibilizado por Xiamen Mchem Laboratórios Ltda) ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 7,95 (d, 1H, $J = 10$ Hz); 7,49 (d, 1H, $J = 10$ Hz); 7,24 (t, 1H, $J = 10$ Hz); 2,34 (s, 3H); 2,24 (s, 3H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm) 170,6; 169,4; 149,8; 136,5; 132,4; 130,2; 125,8; 122,1; 20,8; 16,2. LC/MS [M – H] $^-$ 150,9

Benzoato de ((2*R*,3*R*)-4-((3*S*,4*aS*,8*aS*)-3-(*terc*-butilcarbamoil)octahidroisoquinolina-2(1*H*)-il)-3-hidroxi-1-(feniltio)butano-2-amino (impureza B):

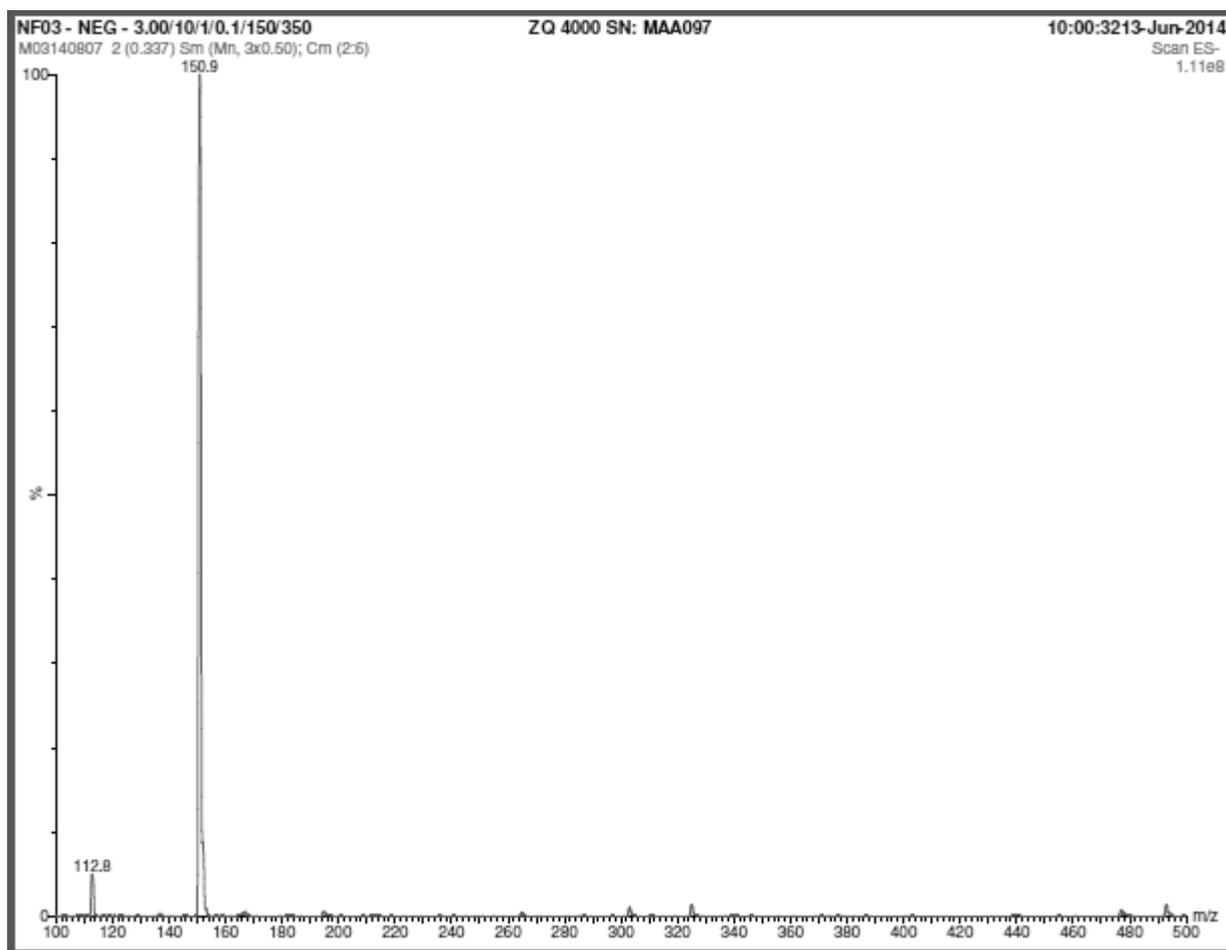
^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 7,95 (d, $J = 10$ Hz, 2H), 7,53 (d, $J = 10$ Hz, 2H), 7,42-7,24 (m, 6H), 3,77-3,70 (m, 2H), 3,10-3,05 (m, 1H), 2,97-2,89 (m, 2H), 2,72 (dd, $J = 15$ Hz, $^2J = 5$ Hz, 1H), 2,48 (t, $J = 15$ Hz, 1H), 2,34 (dd, $J = 15$ Hz, $^2J = 5$ Hz, 1H), 2,23 (dd, $J = 13$ Hz, $^2J = 5$ Hz, 1H), 2,00 (q, $J = 15$ Hz, 1H), 1,82-1,19 (m, 11H), 1,28 (s, 9H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ (ppm) 175,8; 175,1; 138,7; 135,2; 132,1; 131,6; 130,5;

130,4; 128,9; 128,4; 70,3; 66,9; 63,0; 60,3; 57,5; 52,3; 37,7; 35,5; 34,8; 32,2; 31,4; 29,0; 27,7; 27,1; 21,6. LC/MS [M]⁺ 434,2

Mesilato de Nelfinavir:

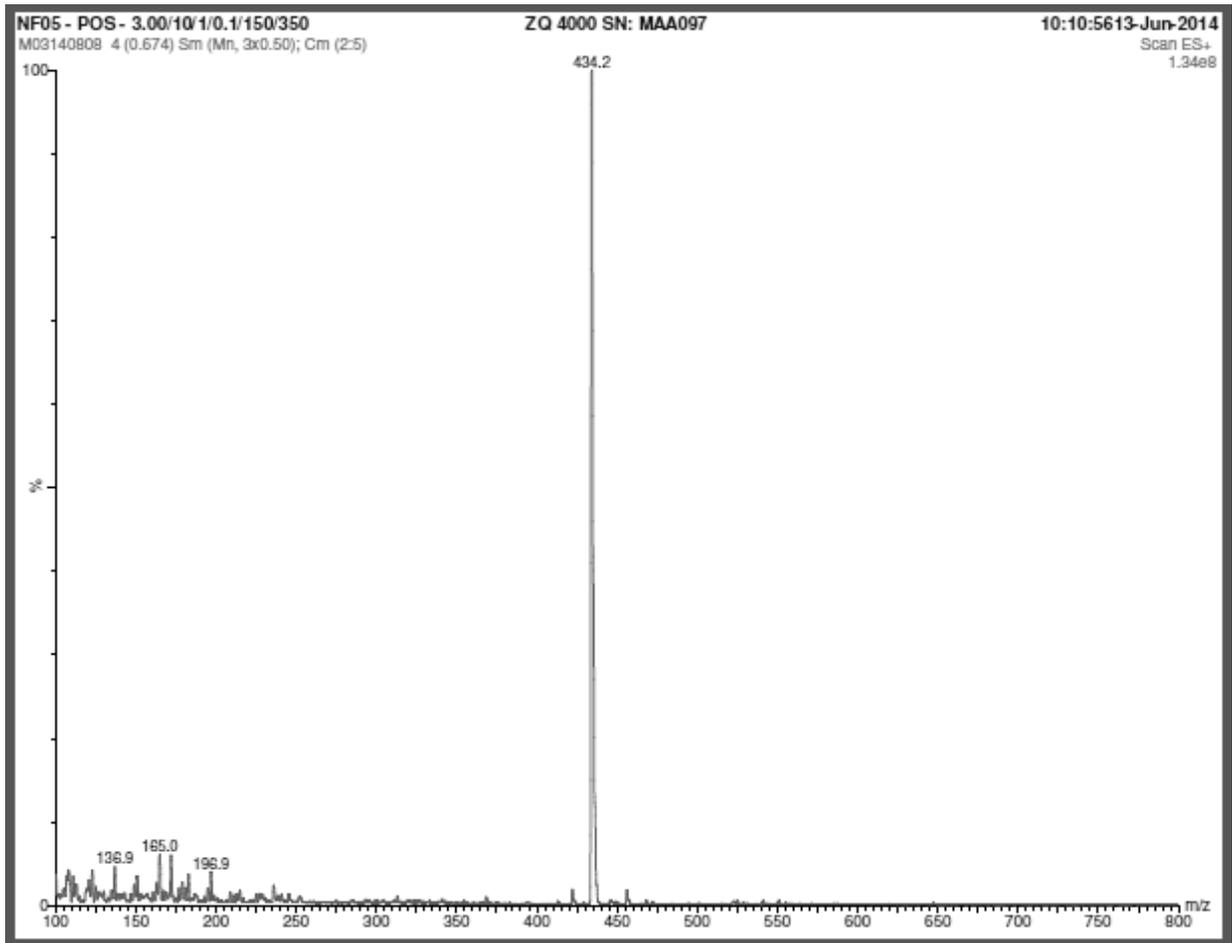
Ponto de fusão = 208°C; rotação óptica = -105° to -115°; ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm) 1,19 (s, 9H), 1,40-1,23 (m, 3H), 1,56-1,45 (m, 2H), 1,74-1,60 (m, 4H), 1,97-1,81 (m, 5H), 2,12 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 3,59-2,88 (m, 4H), 4,08-3,78 (m, 4H), 5,80-5,70 (m, 1H), 6,80 (m, 2H), 7,00-6,94 (m, 1H), 7,19-7,14 (m, 1H), 7,33-7,25 (m, 4H); 8,10 (s, 2H); 9,18-9,02 (br, 1H). ¹³C RMN (D₂O, 100 MHz) δ (ppm) 12,8; 24,1; 26,5; 27,6; 28,0; 28,1; 28,8; 33,8; 35,9; 37,5; 51,0; 52,5; 56,7; 59,4; 69,0; 72,3; 118,8; 119,6; 123,6; 124,8; 127,0; 127,4; 131,0; 134,8; 136,4; 155,6; 164,7; 172,7. Infravermelho (KBr, cm⁻¹): 3277, 3078, 2932, 2862, 2360, 1679, 1644, 1584, 1439, 1208, 1171, 1043, 742, 691, 668. LC/MS [M + H]⁺ 567,9, [M + Na]⁺ 590,1.

Figura S1 – Espectro de Massa da Impureza A



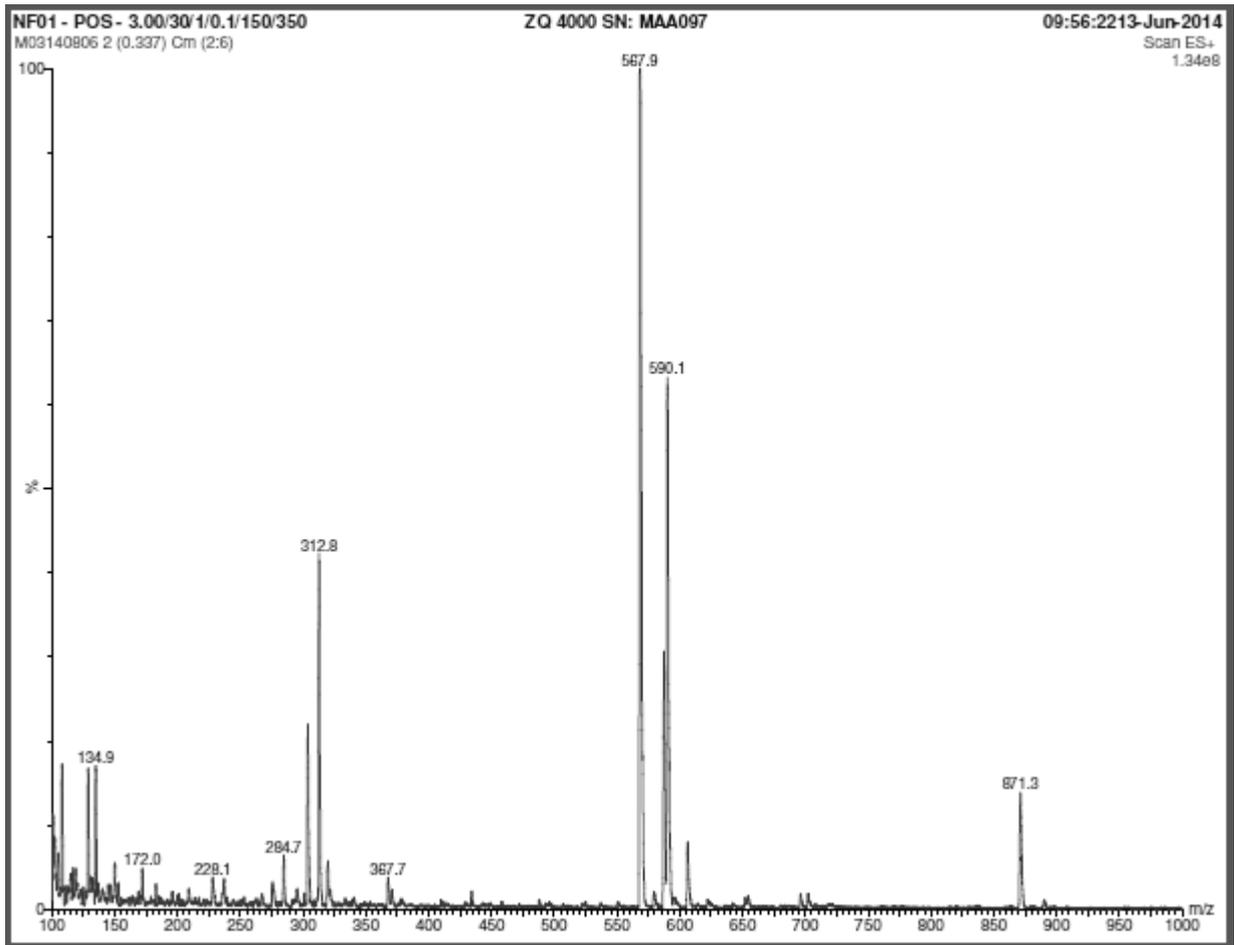
Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Figura S2 – Espectro de Massa da Impureza B



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA

Figura S3 – Espectro de Massa do Mesilato de Nelfinavir



Fonte: ELABORADO PELA PRÓPRIA AUTORA