



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Analítica
Programa de Pós-Graduação em Química

Tese de Doutorado

Preparação, caracterização da fase estacionária C8, com grupo polar uréia embutido e aplicações na análise e no desenvolvimento e validação de métodos para determinação de fármacos.

Paulo Cesar Pires Rosa

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Campinas – SP

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

R71p

Rosa, Paulo Cesar Pires.

Preparação, caracterização da fase estacionária C8, com grupo polar uréia embutido e aplicações na análise e no desenvolvimento e validação de métodos para determinação de fármacos / Paulo Cesar Pires Rosa. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Fase estacionária. 3. Validação de métodos. 4. Análise de fármacos. I. Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Preparation, characterization of C8 stationary phases containing embedded urea groups and applications in the analysis and in the development and validation of methods for determination of pharmaceutical compounds.

Palavras-chaves em inglês: High performance liquid chromatography, Stationary phase, Validation of methods, Analysis of pharmaceutical compounds

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (orientadora), Profa. Dra. Iara Lúcia Tescarollo Dias (Farmácia-USP-Bragança Paulista), Prof. Dr. Dalmo Mandelli (CCNH-UFABC), Profa. Dra. Solange Cadore (IQ-UNICAMP). Prof. Dr. Francisco de Assis Machado Reis (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 20/12/2010

*A Deus pela capacitação e perseverança, à
minha amada esposa Michèlle, aos meus
queridos filhos Dimitri e Jade pelo carinho,
apoio e dedicação, à minha família pelos
primeiros ensinamentos,*

dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À prof. Dra. Isabel Jardim pelos ensinamentos, apoio, disponibilidade e paciência durante este período de tantas mudanças na minha vida. Pela grata amizade, confiança no meu trabalho e compreensão em todas as etapas do projeto.

Às professoras Dra. Carol e Dra. Carla pelos importantes ensinamentos, sempre disponíveis para auxiliar no projeto.

Aos colegas do LabCrom pelos momentos agradáveis que proporcionaram e também a ajuda nas questões da tese, em especial ao César e a Rose pelos ensinamentos, Louise, Lais, Camila, Liane, Anízio, Milena, Juliano, Mariza, Marcel, Priscila, Lucília e tantos outros que muito me apoiaram.

Aos professores, técnicos e funcionários do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas que auxiliaram e contribuíram para a finalização deste projeto.

Aos colegas e as empresas Embrapa, Medley, Eurofarma e EMS pelos incentivos, materiais doados e uso dos equipamentos.

Aos colegas e professores das universidades PUC-Campinas, Unip e Universidade São Francisco pelo incentivo ao trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse finalizado.

CURRICULUM VITAE

1. Formação Acadêmica

- **Bacharelado em Química Industrial**, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce, Abril de 1999.
- **Mestrado em Engenharia Química**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Março de 2005. Título da dissertação: “Estudo da Separação Cromatográfica dos Enantiômeros do Omeprazol em Fase Estacionária Quiral Kromasil CHI-TBB (0,0`-Bis[4-terc-butilbenzoi]l-N,N´-dialil-L-tartadiamida) sob a orientação do prof. Dr. César Costapinto Santana.
- **Bacharelado em Farmácia**, Universidade São Francisco (USF), Campinas-SP, Dezembro de 2009.

2. Iniciação Científica

- Bolsista do Programa PIBIC/CNPq-UFC de agosto de 1996 a julho de 1997. Orientadora: Profa. Dra. Helena Bequer Sales.
- Bolsista IEL-SEBRAE-CNPq para apoio às Micro e Pequenas Empresas - Vulcanização de borracha para automóveis – SEBRAE, de julho de 1997 a dezembro de 1997 .
- Estágio na área de Oceanografia Química – Operação REVIZEE Nordeste III (à bordo do Noc Antares) Ministério da Marinha, de maio de 1998 a junho de 1998.
- Bolsista do Programa PIBIC/CNPq-UFC de agosto de 1998 a abril de 1999. Orientador: Prof. Dr. Francisco Belmino Romero.

3. Experiência Acadêmica

- Monitor da disciplina de Química Geral –Curso de Farmácia – Universidade São Francisco, 02/2006 a 06/2006.
- Professor Nível B1 – Regime Temporário – Pontifícia Universidade Católica de Campinas – PUC Campinas, 2007/2008. Disciplinas ministradas: Química Analítica Instrumental; Físico-Química B, Prática de Formação e Bioquímica funcional.
- Professor Adjunto Universidade Paulista – UNIP, Campinas, 2008/2009. Disciplinas ministradas: Química Orgânica Experimental, Tópicos de Química Orgânica, Química Analítica, Química Geral e Orgânica, Físico-Química.

4. Experiência Profissional

- Analista de laboratório de controle de qualidade, Laboratório Farmacêutico EMS, 1999/2001.
- Assistente de desenvolvimento analítico sênior, Medley Indústria Farmacêutica, 2001/2008.
- Analista de desenvolvimento analítico, Eurofarma Indústria *Farmacêutica*, 2008-2009.
- Coordenador de pesquisa, Laboratório Farmacêutico EMS, 2009/atual.

5. Indicadores de Produção Científica

- Artigos publicados: 4
- Trabalhos apresentados em eventos científicos: 30 sendo 2 na forma de apresentação oral
- Participação em eventos científicos: 10

RESUMO

Preparação, caracterização da fase estacionária C8, com grupo polar uréia embutido e aplicações na análise e no desenvolvimento e validação de métodos para determinação de fármacos

Autor: Paulo Cesar Pires Rosa

Orientador: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Neste trabalho, desenvolveu-se uma nova fase estacionária (FE) (-NH-C(O)-NH-C8) capeada, contendo o grupo polar uréia inserido na cadeia alquila C8. Os estudos de análise elementar, espectroscopia infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^{29}Si confirmaram o sucesso da síntese da FE. A FE foi preparada e foi caracterizada cromatograficamente na separação de misturas testes e de diversas classes de fármacos, no desenvolvimento e validação de métodos para avaliação de misturas de estatinas em cápsulas, clobutinol e doxilamina em xarope e para determinação de impurezas e produtos de degradação dos fármacos alprazolam e cloxazolam. As colunas recheadas com a FE Si-C8-uréia proporcionaram boas separações, com eficiências entre 60.000 e 80.000 pratos m^{-1} e picos simétricos, especialmente para compostos básicos. O comportamento da nova FE foi comparado com os das FE comerciais, obtendo desempenho semelhante na separação de misturas testes e de fármacos, como furoato de mometasona em creme, conservantes como os alquilparabenos, clonazepam e impurezas, valerato de betametasona, clioquinol e tolnaftato em creme, dropropizina em xarope, mistura de paracetamol, cafeína e ácido acetilsalicílico em comprimidos e mistura de cefalexina, prilocaína e amitriptilina. A FE Si-C8-uréia apresentou boa aplicabilidade na separação de fármacos devido ao grupo uréia reduzir a interação dos compostos básicos com os silanóis residuais. Dessa forma, a nova FE possui potencialidade para ser empregada em laboratórios de pesquisa e controle de qualidade, especialmente na análise de compostos básicos.

ABSTRACT

Preparation, characterization of C8 stationary phases containing embedded urea groups and applications in the analysis and in the development and validation of methods for determination of pharmaceutical compounds.

Author: Paulo Cesar Pires Rosa

Supervisor: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

In this work, it a new end-capped stationary phase (SP) containing a urea polar group inserted into the C8 alkyl chain (-NH-C(O)-NH-C8) was prepared. Elemental analysis, infrared spectroscopy and ^{13}C and ^{29}Si nuclear magnetic resonance allowed confirmation of the success of the synthesis of the SP. The new SP was chromatographically characterized by the separation of test mixtures and of different types of pharmaceutical compounds, in the development and validation of methods for analysis of a mixture of statins in capsules, clobutinol hydrochloride and doxilamine in syrups and for determination of impurities and degradation products of the pharmaceutical compounds alprazolam and cloxazolam. Columns containing Si-C8-urea SP showed good separations, with efficiencies between 60 000 and 80 000 plates.m⁻¹ and symmetrical peaks, especially for basic compounds. The behavior of the new SP was compared with commercially available SP and the results showed similar behaviors for separation of test mixtures and of pharmaceutical compounds such as mometasone furoate in creams, preservatives like alkylparabens, clonazepam and impurities, bethametasone valerate, clioquinol and tolnaftate in creams, dropropizine in syrup, mixtures of acetaminophen, caffeine and aspirin in tablets and mixtures of cefalexin, prilocaine and amitriptiline. The Si-C8-urea SP showed good applicability for separation of pharmaceutical compounds due to the urea group reducing the interaction of basic analytes with the residual silanols. Thus, the new SP has the potencial to be employed in research and for quality control, especially for the analyses of basic pharmaceutical compounds.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS _____	xxi
LISTA DE TABELAS _____	xxiv
LISTA DE FIGURAS _____	xxvii
Capítulo I – Introdução Geral _____	1
1. Introdução _____	3
1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência _____	3
1.2. Busca do desempenho cromatográfico _____	3
1.2.1. Equipamento _____	4
1.2.2. FM _____	5
1.2.3. Tipo de eluição cromatográfica _____	6
1.2.4. FE _____	7
1.2.4.1. FE quimicamente ligada _____	8
1.2.4.2. FE com grupo polar embutido _____	10
1.2.4.2.1. Mecanismo de separação das FE com grupo polar embutido _____	15
1.3. Variáveis que influenciam o desempenho cromatográfico _____	16
1.3.1. Tamanho de partícula de sílica _____	16
1.3.2. Dimensão da coluna e Diâmetro interno _____	17
1.3.3. Temperatura _____	18
1.4. Métodos Físicos e Químicos de Caracterização da FE _____	18
1.5. Caracterização Cromatográfica _____	19
1.5.1. Parâmetros cromatográficos _____	20
1.5.2. Testes de avaliação cromatográfica _____	26
1.5.2.1. Mistura teste de Engelhardt _____	26
1.5.2.2. Mistura teste de Tanaka _____	27
1.5.2.3. Mistura de Neue _____	28
1.5. Estabilidade _____	28
2. Importância da Análise de Fármacos _____	29

2.1. Avaliação do mercado farmacêutico _____	29
2.2. Análise de Fármacos _____	31
3. Desenvolvimento de Métodos e Validação _____	33
3.1 Validação _____	35
3.1.1. Especificidade e Seletividade _____	37
3.1.2. Linearidade _____	39
3.1.3. Intervalo linear – Faixa linear _____	41
3.1.4. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) _____	41
3.1.5. Precisão _____	43
3.1.6. Exatidão _____	45
3.1.7. Estabilidade da solução _____	46
3.1.8. Robustez _____	46
Capítulo II – Objetivo _____	49
1. Objetivo _____	51
Capítulo III – Preparação, Caracterização e Avaliação Cromatográfica da FE Preparada. _____	53
1. Introdução _____	55
2. Parte Experimental _____	55
2.1. Materiais _____	55
2.1.1. Equipamentos _____	55
2.1.2. Reagentes _____	56
2.1.3. FE e colunas comerciais _____	57
3. Preparação da FE _____	58
3.1. Síntese do agente sililante _____	58
3.2. Imobilização química do agente sililante à sílica _____	59
3.3. Reação de capeamento _____	59
3.4. Preparo das colunas cromatográficas _____	60
4. Caracterização Química e Física _____	61
4.1. Análise elementar _____	61

4.2. Área superficial e grau de recobrimento _____	61
4.3. Espectroscopia de absorção na região do IV _____	62
4.4. Espectroscopia por RMN de ^1H e de ^{13}C _____	62
4.5. Espectroscopia por RMN de ^{29}Si _____	62
4.6. Espectrometria de massas _____	63
5. Avaliação Cromatográfica _____	63
5.1. Caracterização cromatográfica da FE através de misturas testes _____	63
5.1.1. Mistura Teste I _____	63
5.1.2. Mistura II _____	63
5.1.3. Mistura teste de Neue _____	64
5.1.4. Mistura teste de Engelhardt e Jungheim _____	64
5.1.5. Mistura teste de Tanaka _____	64
5.2 Avaliação da estabilidade química da FE _____	65
6. Resultados e Discussão _____	65
6.1. Preparação do agente sililante e da FE _____	65
6.2. Caracterização química e física _____	66
6.2.1. Análise Elementar _____	66
6.2.1.1. Agente sililante _____	66
6.2.1.2. Análise elementar e espessura da camada da FE _____	66
6.2.2. Análise na região do IV _____	67
6.2.2.1. Análise na região do IV do agente sililante _____	67
6.2.2.2. Análise na região do IV da FE _____	68
6.2.3. Análise de RMN de ^1H para o agente sililante _____	69
6.2.4. Análise de RMN de ^{13}C _____	71
6.2.4.1. Agente sililante _____	71
6.2.4.2. FE Si-C8-uréia _____	72
6.2.5. Análise por RMN de ^{29}Si _____	73
6.2.6. Espectrometria de massas _____	75
6.3. Avaliação cromatográfica com misturas testes _____	76
6.3.1. Avaliação cromatográfica com a mistura teste I _____	76
6.3.2. Separação da mistura II _____	81

6.3.3. Avaliação cromatográfica com a mistura teste de Neue _____	82
6.3.4. Avaliação cromatográfica com a mistura teste de Engelhardt e Jungheim _____	86
6.3.5. Avaliação cromatográfica com a mistura teste de Tanaka _____	87
6.4. Avaliação da estabilidade química da FE _____	91
6.5. Conclusão _____	94

Capítulo IV – Aplicação da FE na Separação de Fármacos e Outros Compostos Presentes em Formulações Farmacêuticas _____

1. Introdução _____	99
2. Parte Experimental _____	99
2.1. Materiais _____	99
2.1.1. Equipamentos _____	99
2.1.2. Reagentes _____	99
2.1.3. FE e colunas comerciais _____	100
2.1.4. Placebos utilizados _____	101
3. Métodos _____	101
3.1. Separação de furoato de mometasona em creme _____	101
3.2. Separação da mistura de clonazepam e compostos relacionados _____	102
3.3. Separação da mistura de alquilparabenos _____	103
3.4. Separação da mistura de paracetamol, cafeína e ácido acetilsalicílico _____	104
3.5. Separação de dropropizina em xarope _____	104
3.6. Separação de clortalidona em comprimidos _____	105
3.7. Separação de uma mistura de cefalexina, prilocaína e amitriptilina _____	106
3.8. Mistura de benzodiazepínicos _____	106
4. Resultados e Discussão _____	107
4.1. Separação de furoato de mometasona em creme _____	107
4.2. Separação da mistura de clonazepam e compostos relacionados _____	108
4.3. Separação da mistura de alquilparabenos _____	110
4.4. Separação da mistura de paracetamol, cafeína e ácido acetilsalicílico _____	112
4.5. Separação de dropropizina em xarope _____	113

4.6. Separação de clortalidona em comprimidos _____	114
4.7. Separação de uma mistura de cefalexina, prilocaína e amitriptilina _____	115
4.8. Mistura de benzodiazepínicos _____	117
5. Conclusão _____	118

Capítulo V – Desenvolvimento e Validação de Métodos para Determinação de Fármacos _____

1. Introdução _____	123
1.1. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos _____	123
1.2. Estudo dos produtos de degradação _____	123
2. Parte Experimental _____	123
2.1. Materiais _____	123
2.1.1. Equipamentos _____	123
2.1.2. Reagentes _____	124
3. Métodos _____	124
3.1. Desenvolvimento e validação de método para separação da mistura de fármacos em creme com ação antiinflamatória e fungicida. _____	124
3.2. Validação do método de separação de uma mistura de estatinas _____	125
3.3. Validação do método de separação de cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina em xarope. _____	126
3.4. Validação do método de separação de alprazolam e produtos de degradação _____	127
3.5. Separação de cloxazolam em comprimidos _____	128
3.5.1 Identificação das impurezas de cloxazolam _____	130
4. Resultados e Discussão _____	130
4.1. Desenvolvimento e validação de método para separação da mistura de fármacos em creme com ação antiinflamatória e fungicida. _____	130
4.2. Validação do método de separação de uma mistura de estatinas _____	133
4.3. Validação do método de separação de cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina em xarope. _____	136
4.4. Validação do método de separação de alprazolam e produtos de	

degradação _____	140
4.5. Separação de cloxazolam em comprimidos _____	146
4.5.1. Desenvolvimento de método para determinação do teor de cloxazolam em comprimidos. _____	148
4.5.2. Desenvolvimento e validação do método de determinação do teor de cloxazolam e impurezas em comprimidos. _____	152
4.5.2.1. Estudo de degradação _____	152
4.5.3. Avaliação da estrutura química das impurezas de cloxazolam _____	160
4.5.4. Validação do método para determinação do teor de cloxazolam e impurezas _____	166
5. Conclusão _____	171
Capítulo VI - Conclusões _____	173
Capítulo VII - Referências Bibliográficas _____	177

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\alpha_{B/P}$ pH 2,7 – capacidade de troca iônica em meio ácido

$\alpha_{B/P}$ pH 7,6 – capacidade de troca iônica total

$\alpha_{C/P}$ – capacidade de formação de ligação de hidrogênio

α_{CH_2} – seletividade metilênica ou hidrofóbica

$\alpha_{T/O}$ – seletividade estérica ou espacial

ACN - acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

As – fator de assimetria a 10 % da altura do pico

C18 – octadecil, $C_{18}H_{37}$

C3 – fase trimetil

C8 – octil, C_8H_{17}

C8e – fase estacionária octilsilano capeada

C8ne - fase estacionária octilsilano não capeada

$C_{16}H_{36}N_2O_2Si$ – agente sililante

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-FR - cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

CP-MAS-NMR 1H - ressonância magnética nuclear de 1H com rotação em ângulo mágico e polarização cruzada

CP-MAS-NMR ^{13}C - ressonância magnética nuclear de ^{13}C com rotação em ângulo mágico e polarização cruzada

CP-MAS-NMR ^{29}Si - ressonância magnética nuclear de ^{29}Si com rotação em ângulo mágico e polarização cruzada

CV – coeficiente de variação

CG - cromatografia a gás

DAD – detector por arranjo de díodo

d.i. – diâmetro interno

DPR – estimativa de desvio padrão relativo

DRIFT – infravermelho com refletância difusa

F - vazão de fase móvel

FE – fase(s) estacionária(s)

FE C8-Kromasil – fase estacionária octil marca Kromasil
Febrafarma - Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica
FEQL – fase(s) estacionária(s) quimicamente ligada(s)
FM – fase(s) móvel(is)
FN – fase(s) estacionária(s) normal(is)
FR – fase(s) reversa(s)
H – altura de prato
HDO - água deuterada
HMDS - hexametildissilazano
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IV – infravermelho
k – fator de retenção
L – comprimento da coluna
LabCrom – Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida do IQ-Unicamp
LD - limites de detecção
LQ – limite de quantificação
 μ - velocidade linear da fase móvel
MM - massa molar
MeOH - metanol
N – número de pratos ou eficiência da coluna
N/L – eficiência de coluna por metro ou números de prato por metro.
n – número de graus de liberdade
 n_c - número de átomos de carbono
-NH-C(O)-NH- grupo polar uréia
ODS – octadecilsilano.
Pc - porcentagem de carbono
P&D – pesquisa e desenvolvimento
Q – espécie do silanol
r – coeficiente de correlação.
RP8 – fase estacionária octilsilano não capeada
RP8e - fase estacionária octilsilano capeada

RP18 – fase estacionária octadecilsilano não capeada
RE – resolução da ANVISA
Rs – resolução entre dois picos adjacentes
s – estimativa do desvio padrão
 s^2 - variância
SBET – área superficial específica determinada pelo método BET
Si-C8-uréia - fase estacionária C8 com grupo polar uréia embutido partículas de sílica nua
SQ – soma quadrática
S/R –relação sinal-ruído
 S_{yx} corresponde à estimativa do desvio padrão da curva analítica
System suitability - parâmetros de conformidade
 τ - espessura da camada
 t – parâmetro da distribuição de Student.
TF – Fator cauda
 t_M – tempo de retenção de um composto não retido.
 t_R – tempo de retenção
 t_{RR} – tempo de retenção relativo
TEA - trietilamina
THF - tetraidrofurano
TMCS - trimetilclorossilano
UV-vis – radiação ultravioleta e luz visível
 V_{col} – volume de coluna
 V_p – volume específico de poros
X – média
 w_b – largura do pico na linha de base
 w_h – largura do pico à meia altura

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Parâmetros cromatográficos de conformidade do sistema. _____	23
TABELA 2. Figuras de mérito e os critérios de aceitação estudados na validação ⁷⁴ . _____	36
TABELA 3. Condições de degradação e os critérios de aceitação estudados na validação ^{74,85} . _____	38
TABELA 4. Percentuais de C, área superficial e espessura da camada das FE comerciais. _____	57
TABELA 5. Percentuais de C, H e N obtidos experimentalmente (exp) e os calculados (calc) para o alcoxissilano. _____	66
TABELA 6. Percentuais de C, H, e N obtidos na análise elementar para a FE Si-C8-uréia antes e após o capeamento e a espessura da camada de FE. _____	66
TABELA 7. Parâmetros cromatográficos obtidos com a FE Si-C8-uréia para as colunas de 60 x 3,9 mm e 125 x 3,9 mm usando FM ACN:H ₂ O 60:40 v/v. _____	78
TABELA 8. Parâmetros cromatográficos obtidos com a FE Si-C8-uréia para as colunas de 60 x 3,9 mm e 125 x 3,9 mm usando FM ACN:H ₂ O 50:50 v/v. _____	78
TABELA 9. Parâmetros cromatográficos da FE Si-C8-uréia e C8-Kromasil comercial para colunas de 150 x 3,9 mm. _____	79
TABELA 10. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura II com a FE C8-uréia. _____	82
TABELA 11. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura de Neue com a FE Si-C8-uréia. _____	83
TABELA 12. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura de Neue com a FE FE comercial LiChrosphere [®] 100 RP8 e LiChrosphere [®] 100 RP8e. _____	83
TABELA 13. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura de Neue com a FE Si-C8-uréia e LiChrosphere [®] 60 Select B. _____	85
TABELA 14. Parâmetros cromatográficos obtidos para a FE Si-C8-uréia na separação da mistura de Engelhardt e Junheim. _____	87
TABELA 15. Parâmetros cromatográficos de avaliação da mistura de Engelhardt e Junheim obtidos com a FE Si-C8-uréia. _____	87

TABELA 16. Parâmetros cromatográficas da FE Si-C8-uréia obtidas pelo protocolo de Tanaka. _____	88
TABELA 17. Parâmetros Cromatográficos obtidos na separação de furoato de mometasona. _____	108
TABELA 18. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação do clonazepam e compostos relacionados. _____	109
TABELA 19. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de alquilparabenos. _____	111
TABELA 20. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura de cefalexina, prilocaína e amitriptilina. _____	117
TABELA 21. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de benzodiazepínicos usando FE Si-C8-uréia. _____	118
TABELA 22. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de valerato de betametasona, clioquinol, e tolnaftato na vazão de FM de 1,2 mL min ⁻¹ . _____	132
TABELA 23. Figuras de mérito da validação do método na determinação valerato de betametasona, tolnaftato e clioquinol em pomada. _____	132
TABELA 24. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de estatinas. _____	135
TABELA 25. Parâmetros de validação do método na determinação de estatinas. ____	135
TABELA 26. Gradiente de fase móvel usado na separação de cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina. _____	138
TABELA 27. Parâmetros cromatográficos da separação de cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina. _____	138
TABELA 28. Figuras de mérito obtidas na validação do método na determinação cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina em xarope. _____	138
TABELA 29. Teor para amostras de xarope contendo CLO e DOX expostas às condições de degradação. _____	139
TABELA 30. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de alprazolam e impurezas. _____	143
TABELA 31. Figuras de mérito da validação do método na determinação alprazolam em comprimidos. _____	143
TABELA 32. Resultados obtidos na determinação da robustez do método para alprazolam. _____	144

TABELA 33. Parâmetros cromatográficos obtidos no estudo da seleção da FM._____	149
TABELA 34. Parâmetros cromatográficos obtidos no estudo da seleção da FM usando TEA. _____	149
TABELA 35. Parâmetros cromatográficos obtidos no desenvolvimento do método de cloxazolam avaliando a composição da solução de TEA._____	150
TABELA 36. Parâmetros cromatográficos obtidos no estudo de volume de injeção.____	151
TABELA 37. Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de cloxazolam e impurezas._____	166
TABELA 38. Figuras de mérito de validação do método na determinação de cloxazolam e impurezas._____	167
TABELA 39. Parâmetros de robustez da validação do método na determinação de cloxazolam e impurezas._____	168
TABELA 40. Resultados do teor de cloxazolam e principais obtidas no estudo de estabilidade para cloxazolam comprimidos de 4 mg._____	170

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Tipos de grupos silanóis e ligações siloxano na superfície da sílica amorfa (adaptado ¹⁴)._____	7
FIGURA 2. Reações para o preparo de FE quimicamente ligadas pela reação de organossilanização._____	9
FIGURA 3. Agentes silanos empregados na organossilanização de FE, monofuncional (A), bifuncional (B) e trifuncional (C). [R = CH ₃ ; R' = normalmente, C ₈ H ₁₇ ou C ₁₈ H ₃₇ ; X = grupos metóxi ou etóxi ou cloro]._____	10
FIGURA 4. Representação esquemática de FE: A) convencional, B) com grupo polar embutido, e C) com grupo polar álcool no capeamento ³¹ ._____	13
FIGURA 5. Prováveis interações durante a separação cromatográfica de um composto básico, amitriptilina, utilizando uma FE com grupo polar do tipo uréia (Adaptado) ^{23,41} ._____	15
FIGURA 6. Espécies de silício presentes na sílica (Q ² , Q ³ , Q ⁴) e espécies presentes na sílica modificada (M ₁ e M ₂)._____	19
FIGURA 7. O cromatograma e suas informações cromatográficas_____	20
FIGURA 8. Medida e cálculo do fator de assimetria._____	22
FIGURA 9. Curva de van Deemter hipotética, mostrando a variação entre a altura do prato (H) com a velocidade linear da FM (μ)._____	25
FIGURA 10. Avaliação da evolução do mercado de genéricos no Brasil de outubro de 2009 a setembro de 2010, comparado aos Estados Unidos (Adaptado ⁶¹)._____	30
FIGURA 11. Gráfico de resíduos: A distribuição normal; B variância residual crescente e C gráfico com tendência residual positiva. (Adaptado ⁹¹)_____	40
FIGURA 12. Cromatograma exemplificando a relação sinal-ruído._____	42
FIGURA 13. Estrutura química da FE LiChrosphere [®] 100 RP8 (A) e LiChrosphere [®] 100 RP8e (B). _____	58
FIGURA 14. Reação de preparo do agente sililante._____	58
FIGURA 15. Reação de imobilização química do agente sililante à sílica._____	59
FIGURA 16. Reação de bloqueio dos grupos silanóis com TMCS e HMDS._____	60
FIGURA 17. Espectro de absorção na região do IV para o agente sililante._____	68

FIGURA 18. Espectros de absorção na região do IV: A) suporte da sílica; B) FE Si-C8-uréia; a) FE Si-C8-uréia antes do capeamento e b) FE Si-C8-uréia após o capeamento._____	69
FIGURA 19. Espectro de RMN de ¹ H para o silano sintetizado._____	70
FIGURA 20. Espectros de RMN de ¹³ C para o silano sintetizado._____	70
FIGURA 21. Espectros de RMN de ¹³ C para a FE Si-C8-uréia (A) antes e (B) após o capeamento._____	73
FIGURA 22. Espectros de CP/MAS de RMN de ²⁹ Si para a sílica pura (A), FE Si-C8-uréia após o capeamento (B) e antes do capeamento (C)._____	74
FIGURA 23. Espectro de massas para o alcoxissilano sintetizado._____	75
FIGURA 24. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste I. Condições cromatográficas: colunas de 60 x 3,9 mm recheada com a FE Si-C8-uréia; volume de injeção: 5 µL; FM: acetonitrila: água; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos analisados: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno._____	76
FIGURA 25. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste I. Condições cromatográficas: colunas recheadas com a FE Si-C8-uréia; volume de injeção: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos analisados: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno._____	77
FIGURA 26. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste I. Condições cromatográficas: dimensão de coluna de 150 x 3,9 mm FE Si-C8-uréia (A) e C8-Kromasil comercial (B); volume de injeção: 5 µL; FM: ACN:H ₂ O 60:40 v/v; vazão: 1,0 mL min ⁻¹ ; detecção UV a 254 nm e temperatura: 25 °C. Compostos analisados: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno._____	79
FIGURA 27. Curva de van Deemter (H x µ) para o naftaleno em diferentes vazões de FM. Coluna 150 x 3,9 mm recheada com a FE Si-C8-uréia; volume de injeção 5 µL; FM: ACN-H ₂ O 60:40 v/v, detecção a 254 nm e temperatura ambiente._____	80
FIGURA 28. Cromatograma obtido na separação da mistura II. Condições cromatográficas: Coluna Si_C8-uréia 125 x 3,9 mm; volume de injeção: 5 µL; FM ACN:H ₂ O (60:40, v/v), vazão 0,8 mL min ⁻¹ ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5)	

acenafteno. _____	81
FIGURA 29. Cromatogramas obtidos na separação dos componentes da mistura de Neue. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; FM: MeOH:20 mmol L ⁻¹ K ₂ HPO ₄ pH 7,0 (65:35, v/v), vazão: 0,8 mL min ⁻¹ ; detecção UV a 254 nm; temperatura: 25 °C; compostos: (1) uracila, (2) propranolol, (3) naftaleno, (4) acenafteno e (5) amitriptilina. _____	82
FIGURA 30. Cromatogramas obtidos na separação dos componentes da mistura de Neue. Condições cromatográficas: A) FE Si-C8-uréia 60 x 3,9 mm e B) Select-B 60 x 3,9 mm; volume de injeção 5 µL; FM MeOH: K ₂ HPO ₄ 20 mmol L ⁻¹ pH 7,0 (65:35, v/v), vazão: 0,6 mL; temperatura: 25 °C; min ⁻¹ ; detecção UV: 254 nm; Compostos: (1) uracil, (2) propranolol, (3) naftaleno, (4) acenafteno e (5) amitriptilina. _____	84
FIGURA 31. Cromatograma obtido na separação da mistura teste de Engelhardt e Junheim: Condições cromatográficas: coluna:125 x 3,9 mm; FE Si-C8-uréia; FM: MeOH:H ₂ O 55:45 (v/v) vazão: 0,8 mL min ⁻¹ ; volume de injeção: 5 µL; detecção UV a 254 nm e temperatura de 40 °C; compostos: (1) uracila, (2) anilina, (3) fenol, (4) N,N-dimetilanilina, (5) tolueno, (6) etilbenzeno. _____	86
FIGURA 32. Cromatogramas obtidos na separação dos componentes das misturas testes de Tanaka na FE Si-C8-uréia, Condições cromatográficas: coluna 125 x 3,9 mm; FM vazão:0,8 mL min ⁻¹ ; volume de injeção: 5 µL; detecção UV a 254 nm e temperatura: 40 °C _____	88
FIGURA 33. Gráfico para a avaliação do fator de retenção na estabilidade da FE Si-C8-Uréia. _____	91
FIGURA 34. Gráfico para a avaliação do fator de assimetria na estabilidade da FE Si-C8-Uréia. _____	92
FIGURA 35. Gráfico para a avaliação da eficiência na estabilidade da FE Si-C8-Uréia. _____	93
FIGURA 36. Gráfico para a avaliação da resolução na estabilidade da FE Si-C8-Uréia. _____	93
FIGURA 37. Estrutura química de furoato de mometasona. _____	102
FIGURA 38. Estrutura química do fármaco clonazepam e compostos relacionados. _	102
FIGURA 39. Estrutura química dos alquilparabenos. _____	103

FIGURA 40. Estrutura química do ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína. _____	104
FIGURA 41. Estrutura química da dropropizina. _____	105
FIGURA 42. Estrutura química da clortalidona. _____	105
FIGURA 43. Estrutura química da amitriptilina, cefalexina e prilocaína. _____	106
FIGURA 44. Estrutura química dos benzodiazepínicos. _____	107
FIGURA 45. Cromatogramas da separação de furoato de mometasona nas colunas Si-C8-uréia 60 x 4,0 mm e coluna Select B 60 x 4,0 mm; Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; FM MeOH: H ₂ O (65:35 v/v); vazão: 0,6 mL/min; detecção UV a 254 nm e temperatura: 25 °C Composto 1 – furoato de mometasona. _____	107
FIGURA 46. Cromatogramas obtidos na separação de clonazepam (1) e compostos relacionados A (2) e B (3). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; colunas Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm (A), C8e 125 x 4,0 mm (B), C8ne 125 x 4,0 mm (C); FM ACN:H ₂ O 60:40; vazão: 0,8 mL min ⁻¹ ; detecção UV a 254 nm e temperatura: 25 °C. _____	109
FIGURA 47. Cromatograma obtido na separação de clonazepam e compostos relacionados. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna RP8e 125 x 4,0 mm; FM: metanol:tetraidrofurano:tampão fosfato de amônio pH 8,0 52:13:60 (v/v/v); vazão 1,0 mL min ⁻¹ ; detecção UV a 254 nm e temperatura 25 °C . _____	110
FIGURA 48. Cromatogramas obtidos na separação de alquilparabenos. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm (A), C8e 125 x 4,0 mm (B); C8ne 125 x 4,0 mm (C); FM: ACN:H ₂ O 50:50 v/v; vazão: 0,8 mL/min; detecção UV a 254 nm e temperatura: 25 °C, Compostos: 1-metil, 2-etil, 3-propil e 4-butilparabeno. _____	111
FIGURA 49. Cromatograma da separação de paracetamol (1), cafeína (2) e AAS (3). Condições cromatográficas: volume de injeção 5µL; FM MeOH: H ₂ O pH 2,5 30:70 (v/v), vazão: 0,8 mL min ⁻¹ , detecção UV a 254 nm e temperatura de 25 °C. _____	112
FIGURA 50. Cromatograma obtido na separação de dropropizina em xarope. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM: tampão pH 3,0 (TEA 0,05%):metanol (95/5 v/v); vazão 1,0 mL/min, detecção UV a 240 nm, temperatura de 30 °C, Compostos: (1) excipiente e (2) dropropizina. _____	113

- FIGURA 51.** Cromatograma obtido na separação de clortalidona em comprimidos. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 μL ; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM: metanol: H_2O - H_3PO_4 pH 3,0 (35/65 v/v); vazão 1,0 mL/min, , 25 $^\circ\text{C}$, detecção a 220 nm. Compostos: 1 – excipiente, 2 – clortalidona. _____ **114**
- FIGURA 52.** Espectro de absorção no UV da clortalidona na condição cromatográfica ótima de separação em duas dimensões A) e B) cromatograma em 3D. _____ **115**
- FIGURA 53.** Cromatogramas obtidos na separação de cefalexina (1), prilocaína (2) e amitriptilina (3). Condições cromatográficas: coluna A) FE Si-C8-uréia, B) C8ne e C) C8e; volume de injeção 5 μL ; FM: MeOH: H_2O pH 7,0 (65:35, v/v); Vazão: 1,0 mL min^{-1} , detecção UV a 254 nm e temperatura de 25 $^\circ\text{C}$. _____ **116**
- FIGURA 54.** Cromatograma obtido na separação de benzodiazepínicos. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 μL ; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM: acetonitrila:água (40/60 v/v); vazão 0,6 mL/min, detecção UV a 254 nm e temperatura 25 $^\circ\text{C}$. Compostos: (1) alprazolam, (2) clordiazepóxido, (3) clonazepam e (4) diazepam. _____ **117**
- FIGURA 55.** Estrutura química do valerato de betametasona, clioquinol e tonaftato. _____ **125**
- FIGURA 56.** Estrutura química das estatinas sinvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina e atorvastatina. _____ **126**
- FIGURA 57.** Estrutura química do cloridrato de clobutinol (a) e succinato de doxilamina (b). _____ **127**
- FIGURA 58.** Estrutura química do alprazolam. _____ **128**
- FIGURA 59.** Estrutura química do cloxazolam. _____ **129**
- FIGURA 60.** Cromatogramas obtidos na separação da mistura de anti-inflamatórios em creme. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM: ACN: H_2O pH 3,0 (60:40 v/v); detecção UV a 240 nm e temperatura: 25 $^\circ\text{C}$. A: vazão 1,2 mL min^{-1} e B 1,0 mL min^{-1} . Compostos: 1-valerato de betametasona, 2-clioquinol, 3-tolnaftato, * excipiente. _____ **131**
- FIGURA 61.** Cromatograma obtido na separação das estatinas na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; coluna Si-C8-uréia 150 x 3,9mm; FM: ACN:THF: H_2O 47:18:35 v/v/v pH 3,0; vazão:0,8 mL min^{-1} ;

- detecção: UV a 238 nm e temperatura: 35 °C. Picos: 1- pravastatina, 2-atorvastatina, 3-fluvastatina, 4-lovastatina e 5-sinvastatina. _____ **134**
- FIGURA 62.** Cromatogramas obtidos na da separação dos compostos (1) succinato de doxilamina e (2) cloridrato de clobutinol. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; coluna FE Si-C8-uréia de 125 x 3,9 mm; FM: gradiente MeOH:ACN:tampão KH₂PO₄ pH 3,0; detecção: 262 nm para o succinato de doxilamina e a 230 nm para o cloridrato de clobutinol temperatura: 25 °C. A - padrão, B - amostra de xarope, * excipiente. _____ **137**
- FIGURA 63.** Cromatogramas obtidos no estudo de degradação forçada do alprazolam em meio oxidativo (peróxido 3 %). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm. FM: MeOH:H₂O (40:60 v/v); vazão: 0,6 mL/min; detecção UV a 254 nm e temperatura de 25 °C. Cromatograma A – meio oxidativo, B – Controle, C- Placebo e D – Fase móvel. _____ **142**
- FIGURA 64.** Curva analítica e gráfico de resíduos para alprazolam. _____ **144**
- FIGURA 65.** Gráfico representativo das recuperações de padrão temperatura e luz e amostra luz em relação a Padrão e Amostra na temperatura ambiente e em vidraria âmbar. _____ **145**
- FIGURA 66.** Gráfico representativo da estabilidade da solução amostra de alprazolam comprimidos. _____ **146**
- FIGURA 67.** Cromatograma obtido na separação de cloxazolam em comprimidos. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM: ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50/50 v/v; vazão 1,0 mL/min; detecção a 244 nm e temperatura: 25 °C _____ **151**
- FIGURA 68.** Espectro de absorção no UV do cloxazolam na condição cromatográfica ótima de separação em duas dimensões (a) e (b) cromatograma em 3D. _____ **152**
- FIGURA 69.** Cromatogramas obtidos no estudo de degradação do cloxazolam em meio básico (NaOH 0,1 mol L⁻¹). Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50/50 v/v, vazão 1,0 mL/min; detecção UV a 244 nm e temperatura 25 °C. Cromatograma de A-padrão, B-amostra, C-placebo e D-diluyente. Compostos: 1- cloxazolam, 2- impureza. _____ **153**
- FIGURA 70.** Espectro de absorção no ultravioleta de amostra e padrão de

- cloxazolam em meio básico e padrão de cloxazolam em ACN. A-cloxacolam e B-Impureza. _____ **153**
- FIGURA 71.** Cromatogramas obtidos no estudo de degradação do Cloxazolam em meio oxidativo (H₂O₂ 3,0%). Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50/50 v/v, vazão 1,0 mL/min; detecção UV a 244 nm e temperatura: 25 °C Cromatograma de A-padrão, B-amostra, C-placebo e D-diluyente. Compostos: 1- cloxazolam, 2- impureza _____ **154**
- FIGURA 72.** Espectros de absorção no ultravioleta de padrão de cloxazolam em meio oxidativo, A cloxazolam e B impureza. _____ **154**
- FIGURA 73.** Espectros de absorção no ultravioleta para impurezas de cloxazolam em meio oxidativo, A e B impurezas. _____ **155**
- FIGURA 74.** Cromatogramas obtidos no estudo de degradação do Cloxazolam em meio ácido (Ácido HCl 0,1 mol L⁻¹). Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50/50 v/v, vazão 1,0 mL/min, detecção UV a 244 nm e temperatura 25 °C. Cromatograma de A-padrão, B-amostra, C-placebo e D-diluyente. Compostos: 1- impurezas, 2- cloxazolam. _____ **155**
- FIGURA 75.** Espectro ultravioleta de padrão de cloxazolam em meio ácido. A, B, e D impurezas, C cloxazolam. _____ **156**
- FIGURA 76.** Cromatogramas obtidos no estudo de degradação do cloxazolam em condições fotolíticas. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50/50 v/v, vazão 1,0 mL/min; detecção UV a 244 nm e temperatura: 25 °C. Cromatograma de A-padrão degradado, B-padrão controle, C-placebo e D-diluyente. Compostos: 1- cloxazolam, 2- impureza _____ **157**
- FIGURA 77.** Espectros de absorção no ultravioleta da amostra de cloxazolam exposto à luz. A-Cloxacolam e B-impureza. _____ **157**
- FIGURA 78.** Cromatogramas obtidos no estudo de degradação do cloxazolam em meio térmico. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50/50 v/v, vazão 1,0 mL/min; detecção UV a 244 nm e temperatura: 25 °C. Cromatograma de A-padrão degradado, B-padrão controle, C-placebo e D-diluyente. Compostos: 1- cloxazolam, 2-

impureza. _____	158
FIGURA 79. Espectros de absorção no ultravioleta da amostra de cloxazolam exposto à temperatura. A-Cloxazolam e B-impureza. _____	158
FIGURA 80. Espectros de absorção no infravermelho do padrão de cloxazolam em estado sólido exposto à luz e temperatura. _____	159
FIGURA 81. Espectro de absorção ultravioleta do padrão de cloxazolam conforme Farmacopéia Japonesa (adaptado) ¹³⁹ _____	159
FIGURA 82. Cromatogramas obtidos na separação de cloxazolam e padrão de impurezas por CLAE-DAD-EM. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM: ACN:TEA 0,1% H 7,0 50/50 v/v, vazão 1,0 mL/min; temperatura 25 °C e detecção UV a 244 nm. Cromatograma: 1 – cloxaetanolamina, 2 –aminobenzofenona e 3 – cloxazolam. A) padrões cloxaetanolamina e benzofenona, B) cloxazolam. _____	160
FIGURA 83. Cromatograma obtido na separação da mistura de cloxazolam e impurezas por CLAE-DAD-MS. Condições cromatográficas: idênticas à Figura 82. ____	161
FIGURA 84. Cromatograma obtido na separação de cloxazolam e impureza em comprimidos de cloxazolam com 18 meses de fabricação. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM: ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50/50 v/v, vazão 1,0 mL/min; temperatura: 25 °C e detecção a 244 nm. Cromatograma: 1- cloxaetanolamina e 2-cloxazolam. _____	161
FIGURA 85. Espectros de absorção no ultravioleta da amostra de comprimido de cloxazolam em 18 meses de estudo de estabilidade. A-Cloxazolam e B-impureza. _____	162
FIGURA 86. Espectro de massas obtido para o pico de cloxazolam em ACN. _____	162
FIGURA 87. Espectro de massas obtido por CL-EM/EM para o íon m/z 349 de cloxazolam em ACN. _____	163
FIGURA 88. Espectro de massas obtido para o pico de cloxaetanolamina em ACN. _____	163
FIGURA 89. Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do íon m/z 367de cloxaetanolamina em ACN. _____	164
FIGURA 90. Espectro de massas obtido para o pico de aminobenzofenona em	

ACN. _____	164
FIGURA 91. Espectro de massas obtido por CL-EM/EM para o pico de aminobenzofenona em ACN. _____	165
FIGURA 92. Espectro de massas obtido por CL-EM para o pico de cloxazolam em ACN:H ₂ O 50:50 v/v. _____	165
FIGURA 93. Espectro de massas obtido por CL-EM/EM para o íon m/z 367 obtido a partir do pico de cloxazolam em ACN:H ₂ O 50:50 v/v. _____	166
FIGURA 94. Curva analítica (A) e gráfico de resíduos (B) do ajuste linear para o cloxazolam. _____	167
FIGURA 95. Gráfico de estabilidade para cloxazolam nas soluções (▲) padrão e (●) amostra. _____	169

Capítulo I

Introdução Geral

1. Introdução

1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição dos mesmos entre duas fases, a estacionária e a móvel. Entre os métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica analítica de separação indispensável e que tem, a cada dia, se solidificado como uma técnica importante de quantificação e identificação em laboratórios dos mais diferentes ramos. Entre os tipos de CLAE, a CLAE em fase reversa apresenta algumas vantagens frente às outras técnicas analíticas que também são aplicadas no desenvolvimento de métodos e na rotina de um laboratório de controle de qualidade. O uso de fases móveis (FM) com uma menor quantidade do componente orgânico e o rápido equilíbrio da coluna após a alteração da FM, seja no modo gradiente ou no isocrático, permite uma análise com redução de custos com melhores separações. Outra vantagem é o amplo campo de aplicação devido à separação de compostos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades^{1,2}.

Fatores que têm influenciado o rápido crescimento da CLAE são o estudo contínuo de novas fases estacionárias (FE) para aplicações específicas de uma determinada classe de compostos, o desenvolvimento de equipamentos mais robustos e de novos detectores e a disponibilidade de material didático e de publicações variadas sobre cromatografia.

1.2. Busca do desempenho cromatográfico

Ao desenvolver um método analítico busca-se primeiramente obter separações com bom desempenho cromatográfico, que resulte em uma separação completa entre os compostos analisados.

O método analítico para determinação de teor e impurezas deve sempre buscar a seletividade do analito de interesse entre os diversos componentes da formulação do medicamento, as impurezas, os produtos de degradação e a FM/diluyente. O desempenho cromatográfico é influenciado pelo equipamento, FM, FE, temperatura e tipo de eluição³.

1.2.1. Equipamento

O equipamento de CLAE escolhido para a análise também deve possibilitar uma separação adequada do composto selecionado em um tempo razoável. Para tanto, alguns itens relacionados ao sistema de CLAE como bomba, detector e injetores são relevantes para o desenvolvimento de uma boa separação.

As bombas com programadores permitem o uso de eluição por gradiente, geralmente aplicada aos compostos com polaridades diferentes, como impurezas de síntese do fármaco e compostos relacionados. Na eluição por gradiente, quantidades crescentes do solvente mais forte são adicionadas a outro, aumentando a força do eluente para obtenção de uma separação satisfatória. O sistema de bombeamento não deve gerar no detector ruídos que possam encobrir sinais mais fracos⁴.

O injetor manual, de maneira geral, é composto de uma válvula de injeção que possui alça de amostragem de volume fixo. Alguns sistemas recentes possuem uma seringa de injeção que mede o volume a ser usado na injeção. Esses sistemas permitem a injeção de volumes pequenos com boa reprodutibilidade, fato importante quando se faz necessária a injeção de soluções concentradas de fármaco, sob condições de degradação, para que os produtos de degradação sejam detectados. Os injetores produzidos nos últimos anos apresentam a opção de refrigeração do compartimento de amostras, que pode ser importante para soluções de compostos termolábeis, evitando a degradação da amostra.

O sistema de detecção deve garantir que propriedades do analito sejam detectadas como a absorção de luz na região do ultravioleta e visível. Os detectores de absorção no ultravioleta e o de arranjo de diodos são os mais utilizados nas indústrias farmacêuticas, pelo fato de que a maioria dos fármacos apresenta absorção na região do ultravioleta. Para compostos como hormônios, como gestodeno e etinilestradiol, que são usados na produção de vários anti-concepcionais, é necessário um sistema cromatográfico que emprega dois detectores em série, sendo um de ultravioleta para detecção do gestodeno e outro de fluorescência para detecção do etinilestradiol^{5,6}.

O detector por índice de refração é considerado universal por ser sensível a todo tipo de soluto. Entretanto, não é aplicado para separações com o uso de eluição por gradiente, pois é sensível às mudanças de vazão e de temperatura. É aplicado na separação de sorbitol⁵, amplamente utilizado em xaropes e em soluções e suspensões em substituição ao açúcar.

O detector de espalhamento de luz é sensível a qualquer constituinte que seja significativamente menos volátil que a FM e permite a detecção de fármacos como os constituintes do Ginkgo biloba, as terpenolactonas^{5,7}.

1.2.2. FM

Na CLAE as espécies que estão sendo avaliadas sofrem influência da FE e, ao mesmo tempo, as propriedades destas são continuamente influenciadas pela FM. Na CLAE, a FM deve ser um líquido mais polar quando se trata de fase reversa (FE apolar) ou mais apolar quando se trata de fase normal (FE polar). A FM exerce duas funções principais, a primeira é arrastar os componentes da amostra através do sistema cromatográfico e a segunda é participar do processo de separação⁸. Um solvente ou uma mistura de solventes com tampão para ser selecionado como FM deve considerar as suas características físico-químicas, a força cromatográfica, a seletividade e a toxicidade.

As principais características físico-químicas requeridas das FM utilizadas em CLAE são⁸:

- alto grau de pureza e fácil purificação;
- solubilizar a amostra sem decompor os seus componentes;
- não decompor ou dissolver a FE;
- ter baixa viscosidade;
- ser compatível com o tipo de detector utilizado;
- ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra.

Uma FM ideal deve também apresentar baixa toxicidade, ser passível de reuso e ser de custo reduzido.

De modo geral, em qualquer tipo de CLAE a FM é de extrema importância, pois participa do processo de separação. Parâmetros importantes, como seletividade da separação, tempo de retenção e solubilidade do composto de interesse na FM, apresentam consideráveis variações em função das mudanças de composição na FM. A força cromatográfica da FM mede a sua capacidade em interagir com os componentes da amostra. Essas interações são devido às diferenças forças como as de van der Waals, as

dipolo-dipolo, ligação de hidrogênio e iônicas. A retenção de um componente é controlada pela força do solvente. Uma FM considerada forte em CLAE-FR apresenta alta proporção do modificador orgânico, como metanol, acetonitrila ou tetraidrofurano, em relação a água, e a separação com essa FM ocorre com tempos de retenção menores. O uso de FM com menor proporção de solvente orgânico permite separação com tempos de retenção maiores.

As soluções tampão são muito utilizadas em CLAE uma vez que muitos compostos são iônicos ou ionizáveis e a separação necessita ser realizada em pH definido. A escolha da solução tampão depende do valor do pKa do analito, do pH da FM a ser utilizada e também da sua absorção no ultravioleta. O pH do tampão deve estar dentro da faixa do pKa da substância: $\text{pH} = \text{pKa} \pm 1,0$. Assim, para compostos ácidos, a solução tampão de pH menor que uma unidade que o pKa produz espécies moleculares e em pH maior que uma unidade do pKa resulta em espécies ionizadas (ânions). De forma similar, para compostos básicos, a solução tampão de pH como uma unidade maior que o pKa resulta em espécies moleculares e pH menor que o pKa em uma unidade resulta em espécies ionizadas (cátions)⁸.

1.2.3. Tipo de eluição cromatográfica

A eluição em CLAE pode ser isocrática ou por gradiente^{4,8,9}. A eluição isocrática é a mais utilizada nos métodos farmacopéicos e, nesse modo, a força cromatográfica da FM permanece constante durante toda a separação. A eluição isocrática permite separações mais simples, reprodutíveis e de menor custo por usar uma única bomba de alta pressão. Na eluição por gradiente, a composição da FM é alterada durante o decorrer da separação. Desta forma, este modo de eluição é mais aplicado às misturas complexas, que contêm compostos com estruturas químicas e polaridades diferentes, como é o caso de impurezas e produtos de degradação. Apesar de possuir algumas limitações em relação ao tipo de detector e resultar em maiores ruídos da linha de base, em certos casos, como a de separações complexas, a eluição por gradiente é a mais indicada. A eluição por gradiente é recomendada nas seguintes situações: amostras com ampla faixa de fator de retenção; amostras contendo interferentes com valores de fator de retenção que aumentam o tempo de análise; soluções diluídas em um solvente fraco e separações de macromoléculas como proteínas, peptídeos e polímeros sintéticos⁸.

1.2.4. FE

As FE geralmente utilizadas em CLAE são constituídas por um suporte sólido, modificado ou não, sobre o qual é depositada uma fase líquida. Essa pode estar sorvida, auto-imobilizada, imobilizada ou quimicamente ligada ao suporte⁸.

Um material ideal, para ser utilizado como suporte, deve apresentar as seguintes características^{3,4,10,11}, ser poroso, possuir uma alta concentração de grupos ativos em sua superfície, possuir área superficial suficientemente grande para aumentar a capacidade de aceitação da amostra, ter inércia química e resistência mecânica alta.

Como suportes podem ser usados os óxidos inorgânicos como sílica, alumina, titânia, zircônia e carbono grafitizado. Dentre os óxidos metálicos a sílica é o suporte de maior utilização e pode ser modificada com os óxidos de titânio ou de zircônio.

A ampla utilização da sílica está relacionada às suas propriedades altamente favoráveis para aplicações cromatográficas e, dentre elas, podem ser destacadas: partículas pequenas e esféricas disponíveis em uma ampla variedade de diâmetro (1 a 20 μm , a maioria com distribuição de tamanho reduzida) e tamanhos de poros (6 a 400 nm); partículas altamente porosas com grande área superficial (100 a 500 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$); alta força mecânica (elevada rigidez) adequada para resistir às pressões elevadas necessárias em CLAE; e facilidade de modificação de sua superfície, devido à presença de grupos hidroxilas (silanóis) bastante reativos^{12,13}, principalmente por reações dos grupos silanóis com reagentes, como triclorooctadecilsilano ou clorodimetiloctadecilsilano que produzem ligações do tipo $\equiv\text{Si-O-Si-C}\equiv$.

A sílica apresenta uma superfície irregular quanto ao tipo de espécies químicas, que podem ser: silanóis livres ou isolados, vicinais ou geminais e ligações tipo siloxano ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$). A Figura 1 apresenta a forma como os silanóis estão presentes na superfície da sílica.

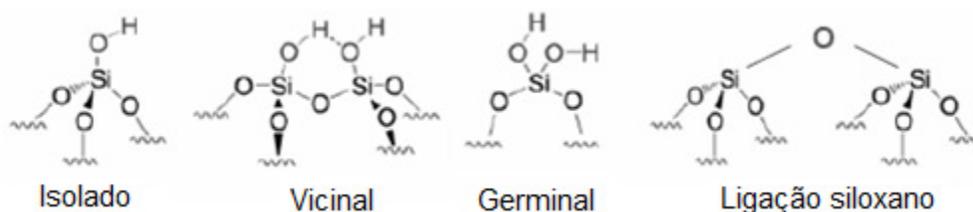


Figura 1- Tipos de grupos silanóis e ligações siloxano na superfície da sílica amorfa (adaptado¹⁴).

As propriedades que fazem da sílica um óxido altamente interessante, capaz de interagir com as mais diversas espécies orgânicas, fornecendo FE de diferentes seletividades, são determinadas: (i) pela alta atividade química da superfície – esta atividade depende da concentração e da distribuição dos diferentes grupos silanóis, e não das ligações siloxano; e (ii) pela sua estrutura porosa¹⁵.

Os grupos silanóis presentes na sílica lhe conferem um caráter ácido que traz algumas propriedades trocadoras de íons que são altamente dependentes do pH, da área superficial e da concentração dos grupos silanóis. Desta forma, a aplicação da sílica é limitada ao intervalo de pH 2,0 e 8,0. Para pH maior que 8,0, a sílica se solubiliza lentamente, alterando a compactação da coluna e levando a alterações na retenção do soluto e perda de eficiência¹². Quando o pH da FM for menor que 2, a hidrólise, catalisada por ácido, das ligações Si-C entre a superfície da sílica e o material ligado quimicamente torna-se significativa. Isto resulta em perda contínua da fase ligada, concomitante com a perda de retenção cromatográfica.

1.2.4.1. FE quimicamente ligada

Um dos fatores que podem explicar o rápido crescimento da CLAE pode estar relacionado aos avanços na tecnologia de preparo das FE. Diferentes FE têm sido preparadas com o intuito de redução dos silanóis residuais e obtenção de uma melhor separação. Processos como o capeamento permitem uma melhor proteção desses grupos para que possam ter menor interação com o analito¹⁶.

Na CLAE-FR, um importante fator que impulsionou esse crescimento foi a introdução das FE quimicamente ligadas (FEQL), nas quais, cadeias orgânicas são ligadas covalentemente à superfície do suporte, fornecendo alta estabilidade hidrolítica ao líquido estacionário¹⁷. A FEQL apresenta como principais vantagens a maior estabilidade química, devido à ligação covalente; a possibilidade de uso de maiores valores de vazão de FM e temperatura; maior liberdade de escolha de FM e o possível uso de eluição por gradiente. Como não há uma FE com características ideais, a FEQL também apresenta algumas desvantagens que são importantes destacar para sua melhor aplicação: menor recobrimento de superfície, devido ao impedimento estérico que faz com que se consiga que no máximo 50% dos grupos silanóis consigam reagir; interações indesejáveis, devido aos silanóis residuais que podem adsorver compostos básicos reversivelmente,

ocasionando o aparecimento de picos largos e assimétricos, ou adsorção irreversível que pode levar a deterioração da coluna e, outro fator limitante, seria o uso restrito no intervalo de pH de 2 a 8⁸.

As FEQL podem ser obtidas através de diversas reações químicas a partir da sílica ou de outros suportes¹. A reação mais utilizada para o preparo das FEQL é a da organossilanização^{1,7} (Figura 2), na qual os grupos silanóis da sílica reagem com organossilanos, resultando em FE com ligações do tipo siloxano ($\equiv\text{Si-O-Si-C}\equiv$).

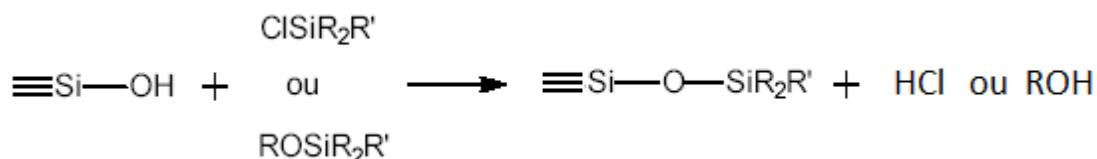


Figura 2. Reações para o preparo de FE quimicamente ligadas pela reação de organossilanização.

Nas reações para obtenção de FEQL, é realizada uma etapa inicial para ativar os grupos hidroxilas da superfície da sílica através de aquecimento, para remover as moléculas de água ligadas à superfície da sílica. Na sequência, faz-se a reação da sílica com um organossilano⁸. As FE deste tipo são as mais estáveis hidroliticamente e as colunas recheadas com este material exibem eficiências mais altas, devido ao rápido processo de transferência de massas¹⁷.

O agente sililante tem um ou mais grupos funcionais reativos, que podem ser cloretos ou grupos etóxi ou metóxi; R' é uma cadeia alifática ou uma cadeia alifática com grupos terminais polares que se deseja introduzir no suporte; e R é normalmente, um grupo metila^{8,18,19} ou grupos mais volumosos como isopropil ou isobutil. Os organoclorossilanos são mais reativos que os organoalcóxissilanos, sendo necessária nas reações com organoclorossilanos a presença de um catalizador, que pode ser uma base receptora de prótons, como a piridina ou a lutidina.

O agente sililante pode ser monofuncional, bifuncional ou trifuncional conforme o grupo reativo ligado diretamente ao átomo de silício (Figura 3)¹⁸. Outro fator importante é a ausência ou a presença de água durante a síntese, que podem resultar em fases monoméricas ou poliméricas, respectivamente, as quais apresentam características físicas e cromatográficas bastante distintas.

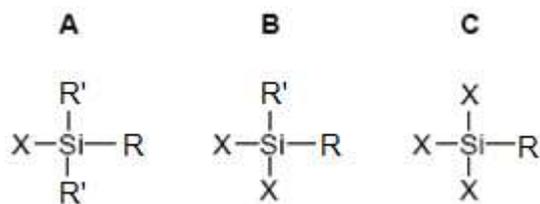


Figura 3. Agentes sililantes empregados na organossilanização de FE, monofuncional (A), bifuncional (B) e trifuncional (C). [R' = CH₃; R = normalmente, C₈H₁₇ ou C₁₈H₃₇; X = grupos metóxi ou etóxi ou cloro].

As FE monoméricas são obtidas através da reação da sílica com organossilanos mono, bi ou tri funcionais na ausência de moléculas de água. A grande vantagem deste método é a alta repetibilidade do preparo das fases, uma vez que cada grupo silanol reage com uma molécula do silano⁴. As colunas cromatográficas recheadas com a fase monomérica apresentam as eficiências mais altas devido à cinética favorável envolvendo a rápida difusão dentro e fora da camada orgânica fina da FE. No entanto, possuem menor estabilidade química. FE poliméricas apresentam menor eficiência e repetibilidade na preparação, porém são mais estáveis tanto em pH alto como baixo, devido a um maior recobrimento da superfície da sílica.

1.2.4.2 FE com grupo polar embutido

Após o processo de ligação química do organossilano à sílica, pode ocorrer que os silanóis residuais que não reagiram com os agentes sililantes, estejam suficientemente acessíveis para interagirem com componentes da amostra durante a separação cromatográfica. Os silanóis residuais são os principais responsáveis pelo aumento da retenção e do alargamento de pico de compostos básicos^{16,19}. Entre os procedimentos relatados na literatura⁸, para a redução da atividade silanofílica das FE está a FE com grupo polar embutido, pois a inserção de grupos polares como amida, amina, uréia e carbamato reduz a interação de solutos básicos com os silanóis residuais.

O desenvolvimento das FE com grupo embutido iniciou com o grupo polar amida. Na primeira geração de FE com grupo polar embutido, a sílica foi modificada em duas etapas, primeiro com um aminossilano e posteriormente com cloretos ácidos^{11,20}. Este processo apresentou uma conversão incompleta, resultando em uma superfície com uma mistura de grupos aminos derivatizados e não derivatizados, ocorrendo a retenção dos analitos por mecanismo duplo, de fase reversa e troca iônica.

A segunda geração de FE com grupo polar embutido continha o grupo carbamato gerado a partir da sua reação com clorossilano monofuncional, seguida da modificação da superfície da sílica, em uma única etapa²¹. O'Gara *et al.*²¹ prepararam esta FE incorporando o grupo carbamato no grupo alquildimetilclorossilano, seguida da reação com a sílica, para que se obtivesse uma estrutura única do ligante, sem possibilidades de troca iônica e com excelente reprodutibilidade das FE na separação de compostos polares, apolares e básicos. O avanço nesta segunda geração de FE reside na sua preparação a partir de uma única modificação da superfície da sílica, na qual o grupo embutido encontra-se inserido dentro do silano, o que propicia a ausência de grupos de troca iônica. Este fato acarreta em uma redução do fator de assimetria na separação de compostos básicos como a amitriptilina^{11,21,22}. Silva *et al.*¹¹ sintetizaram uma FE C18 trifuncional com grupo polar tiocarbamato, seguido pelo processo de capeamento. A FE obtida apresentou boas propriedades para aplicação em CLAE-FR e as características de ligação de hidrogênio, seletividade estérica e interação silanofílica foram aceitáveis¹¹. A comparação da FE com grupo tiocarbamato com outras FE sem grupo polar apontou que a primeira apresentou resultados superiores na separação de compostos básicos e semelhantes para compostos apolares. Na separação de analito básico, amitriptilina, foi obtido fator de assimetria menor que 1,7, comparado ao valor de 5,2, conseguido usando uma FE C18, nas mesmas condições cromatográficas.

Um outro tipo de FE com grupo polar embutido foi obtido com a incorporação do grupo uréia na cadeia alquila usando uma etapa única de modificação da superfície da sílica. Silva *et al.*^{10,23-28}, obtiveram uma modificação homogênea e bem caracterizada da superfície da sílica no preparo de FE com grupos polares uréia. Foram preparadas FE com uma série homóloga de C5, C7, C12 e C18 ureapropiltrialcoxissilano, avaliadas através de parâmetros cromatográficos e caracterização físico-química. As FE obtidas com grupo polar uréia apresentaram separações com picos simétricos, boa eficiência para compostos polares, apolares e básicos. Na separação da mistura teste SRM 869a (Material de Referência Padrão), obtida do NIST (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, EUA), e de compostos como propranolol e amitriptilina foram observadas interações reduzidas com a superfície da sílica, através dos valores próximos a unidade para o fator de assimetria^{11,23,28}.

Silva *et al.*²⁴ avaliaram a estabilidade química da coluna recheada com a FE com grupo polar C18 uréia através da separação da mistura contendo os compostos naftaleno (apolar), dibutilftalado (polar) e amitriptilina e propranolol (básicos). Nesta avaliação, foi usada como FM uma mistura de tampão fosfato e metanol, pois o tampão fosfato é considerado mais agressivo na dissolução da sílica quando comparado com tampões como citrato e Tris. O declínio dos parâmetros cromatográficos e a baixa eficiência obtida após a passagem de 20000 volumes de FM através da coluna mostraram que deve ter ocorrido a dissolução da sílica e não a hidrólise do grupo polar uréia.

Estudos realizados por Silva²³ mostraram que as fases C18 uréia e C18 dimetil uréia separaram, com eficiência, uma mistura complexa de compostos orgânicos pertencentes a uma importante classe de poluentes ambientais e também uma mistura contendo alguns compostos básicos, dentre eles o cloridrato de amitriptilina e o propranolol. Estes resultados foram importantes para confirmar o alargamento do pico devido a possíveis interações com os grupos silanóis residuais na superfície da sílica, que ocorre, geralmente, quando são utilizadas na separação FE convencionais do tipo C18. Foi confirmado que o grupamento uréia embutido na FE minimiza as interações entre os compostos básicos e os silanóis residuais da superfície da sílica.

Silva *et al.*²⁵ prepararam e caracterizaram uma fase C18 uréia baseada em sílica titanizada, obtendo separações cromatográficas para compostos de caráter neutro semelhantes as das FE C18 titanizada, entretanto, para separação de compostos básicos como benzilamina e amitriptilina ainda foram observados picos assimétricos e maior retenção na coluna.

Liu *et al.*²⁹ desenvolveram uma fase com grupo polar embutido contendo sulfonamida inserida em uma ligação eter. A avaliação cromatográfica mostrou que a FE obtida apresentou baixa atividade silanofílica, confirmada pela boa separação do composto básico amitriptilina, boa compatibilidade com FM 100% aquosa, alta seletividade estérica para hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e alta afinidade para nitro compostos. Outro estudo realizado por Liu *et al.*³⁰ foi a preparação e a avaliação de FE com grupo polar embutido, estável hidroliticamente, obtida a partir da síntese de um silano monofuncional e modificação da superfície da sílica por múltiplas reações do ligante à sílica. A característica de estabilidade hidrolítica foi devido à múltiplas ligações covalentes formadas entre o silano e a superfície da sílica e a ligação cruzada entre os ligantes adjacentes. A FE

apresentou compatibilidade com FM 100% aquosa, boa eficiência e picos simétricos na separação de compostos ácidos e básicos como a amitriptilina.

Layne³¹ comparou FE com grupo polar embutido sem capeamento e FE nas quais os reagentes utilizados no capeamento continham grupos polares. Na Figura 4, tem-se a representação esquemática de FE convencionais com grupo polar embutido e com grupo polar no reagente de capeamento.

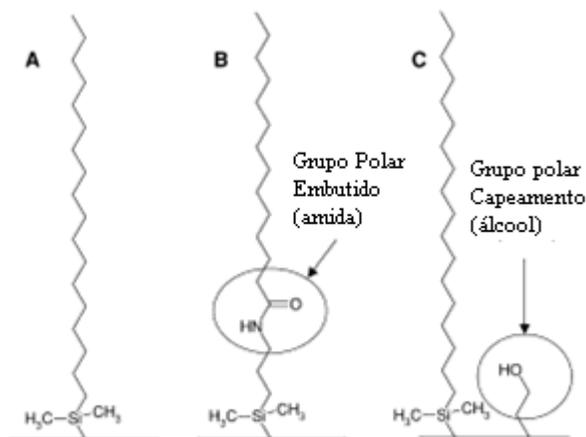


Figura 4 - Representação esquemática de FE: A) convencional, B) com grupo polar embutido, e C) com grupo polar álcool no capeamento³¹.

As FE com grupo polar no reagente de capeamento apresentaram características de retenção hidrofóbica similares às FE C18 convencionais, mas mostraram alta capacidade de ligação de hidrogênio e atividade silanfílica. As FE com grupo polar embutido apresentaram comportamento oposto, com redução da natureza hidrofóbica e diminuição da atividade dos silanóis residuais. Wilson *et al.*³² avaliaram as diferenças de seletividade entre colunas contendo grupo polar embutido na cadeia orgânica, fases contendo grupo polar nos reagentes de capeamento e colunas sem o grupo polar. Os resultados obtidos mostraram que as FE com grupo polar apresentaram menor hidrofobicidade e que as FE com grupo polar no reagente de capeamento são mais semelhantes às FE sem o grupo. Euerby e Petersson³³ realizaram a classificação cromatográfica e comparação entre colunas comerciais contendo grupo polar e com grupo amino no reagente de capeamento, usando análise de componentes principais. Foram avaliadas 18 FE utilizando protocolos de análise cromatográfica, como o teste de Tanaka, misturas ácidas 1 e 2 e teste de Tanaka modificado. O estudo destacou as diferenças entre as FE obtidas pela síntese de uma ou

duas etapas e as características do tipo de sítios de ligação. Coym³⁴ realizou a comparação de FE alquil tradicionais com FE com grupo polar no reagente de capeamento e com FE com grupo polar embutido na cadeia carbônica, na separação de compostos apolares como metileno. Os resultados mostraram que a transferência de entalpia é menos favorável na separação com colunas contendo FE com grupos polares embutidos quando comparado com as outras FE avaliadas.

Hamada *et al.*³⁵ avaliaram a separação de proteínas hidrofóbicas utilizando colunas com grupo polar embutido em cadeia orgânica de quatro carbonos (InertisilWP300 C4). Os resultados obtidos mostraram que a FE apresentou perfil de retenção ideal para proteínas e que o efeito é devido à redução da interação dos grupos silanóis com os grupos polares das proteínas.

Liu *et al.*³⁶ realizaram a análise simultânea de surfactantes aniônico, catiônico e não iônico utilizando uma coluna com FE com grupo polar embutido (Acclaim Surfactant). A coluna apresentou seletividade ideal para os diferentes tipos de surfactantes, com picos simétricos, boa resolução e compatibilidade com FM aquosa.

Rafferty *et al.*³⁷ realizaram a simulação da alteração do comprimento da cadeia carbônica (C18, C8 e C1), da presença de grupo polar amida embutido, da pressão e do formato do poro na retenção em CLAE-FR. Os resultados mostraram diferenças na retenção de analitos polares para as FE avaliadas.

Quiang *et al.*³⁸ prepararam uma FE com grupo polar amida embutido na cadeia carbônica C18. A coluna foi usada na separação de quatro componentes de diidroergotoxina com FM neutras, de composições variadas. Os resultados obtidos mostraram que a FE pode ser usada na separação de compostos alcalóides complexos e apresentou potencial para aplicação na análise farmacêutica e na identificação de produtos naturais. A melhor separação entre os componentes foi obtida usando FM constituída de ACN-20 m mol⁻¹ Na₂HPO₄ 30:70 v/v, pH 7,0.

Rimer e Sander³⁹ avaliaram sete colunas contendo FE com grupo polar embutido para reconhecimento molecular. Foram usadas na avaliação da seletividade da coluna o material de referência padrão SRM 869b e também a mistura teste de Tanaka. Os resultados obtidos para as misturas testes indicaram que somente duas das FE apresentaram separação satisfatória com picos simétricos. As características do

reconhecimento estão diretamente relacionadas ao ligante do grupo polar e também com a temperatura de separação.

Kallel *et al.*⁴⁰ otimizaram as condições de separação de sete tetraciclinas utilizando FE C12 contendo grupo polar embutido, avaliando a influência do pH, modificador orgânico, tampão e temperatura, na eluição dos analitos. Os resultados obtidos mostraram boa separação para os compostos analisados, com boa eficiência e resolução entre as tetraciclinas.

1.2.4.2.1. Mecanismo de separação das FE com grupo polar embutido

O mecanismo através do qual a FE com grupo polar embutido consegue minimizar as interações dos grupos silanóis com os compostos básicos ainda não é totalmente conhecido, porém há pelo menos quatro tentativas de explicação, como mostradas na Figura 5, exemplificando o as prováveis interações com o composto básico, amitriptilina.

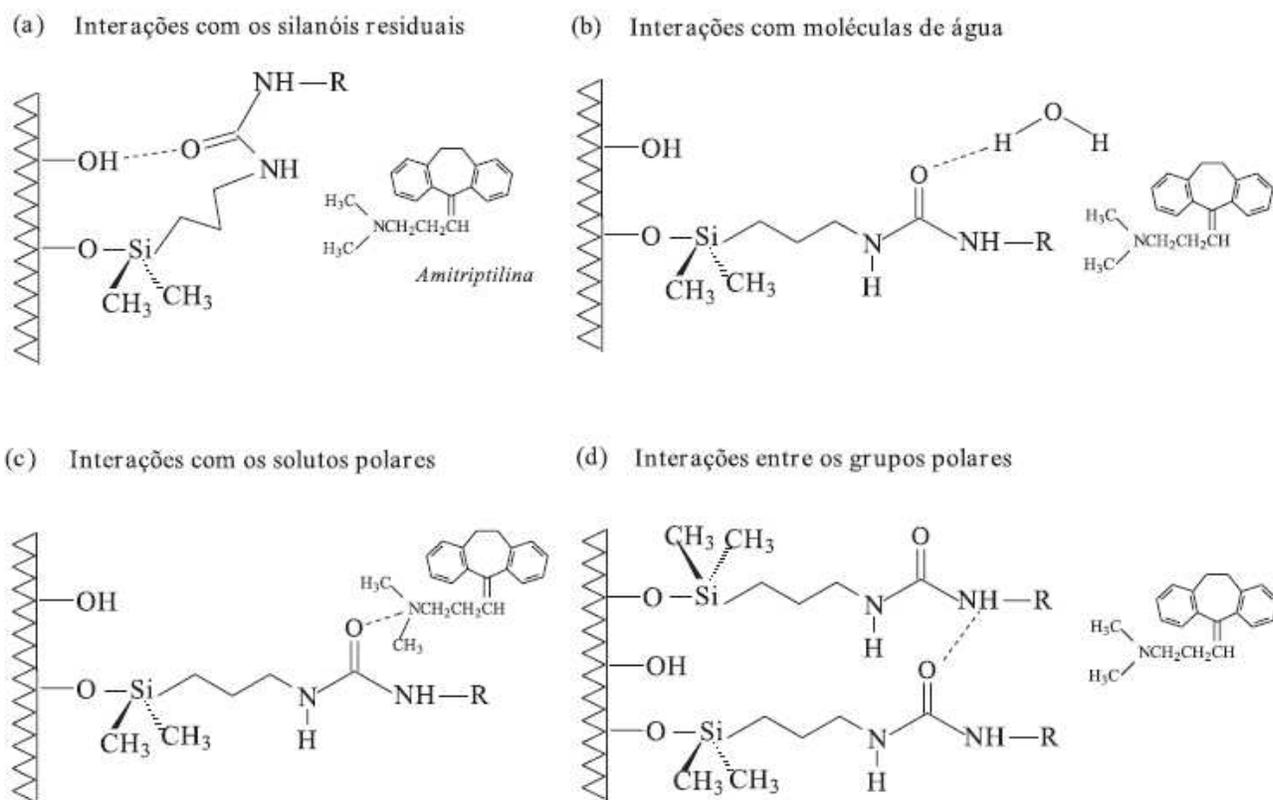


Figura 5 – Prováveis interações durante a separação cromatográfica de um composto básico, amitriptilina, utilizando uma FE com grupo polar do tipo uréia (Adaptado)^{23,41}.

A primeira explicação é que os grupos polares podem interagir com os grupos silanóis da sílica, através de ligação de hidrogênio e, desta forma, os silanóis estarão menos disponíveis para interagirem com os compostos básicos, o que poderia acarretar em picos com melhor simetria e menor alargamento, Figura 5a. A segunda é que os grupos polares podem interagir com moléculas de água da FM, Figura 5b, formando uma suposta barreira de moléculas de água, que poderia diminuir a hidrofobicidade da FE ao redor da superfície, dificultando o acesso de compostos básicos aos grupos silanóis. A terceira explicação propõe que o analito pode interagir preferencialmente com o grupo polar da FE ao invés de interagir com os silanóis residuais^{19,23}, Figura 5d. A quarta é que os grupos polares reagem entre si blindando os grupos silanóis²³, Figura 5d. Uma propriedade adicional da FE com grupo polar é a redução na retenção hidrofóbica. Esta propriedade leva a reduzir a seletividade não polar-polar que são benéficos aos problemas associados com degradante e análises de metabólitos¹⁶.

Esses mecanismos foram propostos para explicar porque essas FE tem a propriedade de minimizar as interações indesejáveis entre os grupos silanóis e os analitos básicos. Algumas evidências mostraram que a superfície da sílica tem uma maior concentração de água, devido às suas ligações de hidrogênio com os respectivos grupos polares, ficando próximas à superfície do suporte cromatográfico. Espera-se a formação de uma barreira “virtual” de moléculas de água, a qual impede, de certa maneira, a interação dos analitos básicos com os silanóis residuais. Outra evidência prática é que com essas fases polares é possível realizar algumas separações cromatográficas utilizando, por exemplo, uma FM com 100% de água. Nas FE clássicas isto não é sempre possível, devido ao colapso que ocorre com as cadeias hidrofóbicas imobilizadas na superfície da sílica, alterando consideravelmente a retenção dos analitos⁴¹.

1.3. Variáveis que influenciam na eficiência cromatográfica

1.3.1. Tamanho da partícula de sílica

O tamanho de partícula da sílica em CLAE é muito importante, porque controla o processo de difusão das moléculas da amostra ao penetrar e sair dos poros da partícula⁸. Quanto maior o tamanho da partícula porosa, mais lento será o processo de difusão e, como consequência, mais lenta será a transferência de massa do analito entre a FE e a

FM, devido ao aumento da profundidade dos poros, o que causa o retardo dos componentes da amostra para sair dos poros profundos⁸. A eficiência de uma coluna recheada aumenta com a redução do tamanho da partícula. Quanto menor o tamanho de partículas, mais eficiente será a separação, com maior número de pratos e melhor resolução, sendo um parâmetro útil a ser avaliado no desenvolvimento de método para separação de impurezas e produtos de degradação. A razão para esse aumento de eficiência é que partículas menores proporcionam um fluxo mais uniforme pela coluna e que o percurso no qual o composto se difunde na FM entre as partículas está na ordem de grandeza do tamanho de partícula⁴. A menor profundidade dos poros diminui e a saída das moléculas da amostra dos poros que ocorre mais rapidamente, permitindo a obtenção de análises mais rápidas sem perda de eficiência⁸. Quanto menor o tamanho de partícula, menor é o caminho de difusão da substância na FM. Entretanto, para partículas de menor tamanho há uma resistência ao fluxo pela FE, ocorrendo aumento da pressão⁴. Estas abordagens explicam o uso em CLAE de partículas esféricas de 3 a 5 µm. No modo de cromatografia líquida de ultraeficiência (UPLC) são usadas partículas menores, na ordem de 1,5 a 2,0 µm.

1.3.2. Dimensão da coluna e diâmetro interno

As colunas convencionais de CLAE, mais empregadas em cromatografia líquida neste momento, apresentam diâmetro interno superior a 3,2 mm e inferior ou igual a 4,6 mm. Em função destas características, a maior parte dos equipamentos projetados para CLAE opera bem com estas colunas, sem modificações ou adaptações. A vazão típica destas colunas situa-se ao redor de 1,0 mL/min, com uma faixa de 0,5 a 2,0 mL/min.

As colunas de diâmetro reduzido apresentam vantagens, como o uso de menor volume de amostra, da ordem de frações de microlitro ou de nanolitros, o que é útil para análise de traços em matrizes ambientais, em fluído biológico⁸ e também no estudo de impurezas e produtos de degradação. As colunas de menor diâmetro interno também permitem menor consumo de FM, menor volume de amostra injetada, para evitar possível sobrecarga na coluna, e menor gasto de FE para seu enchimento. O inconveniente é a baixa repetitividade em vazões reduzidas e a baixa exatidão na injeção de pequenos volumes de amostra⁸. Com o avanço da técnica de micro-CLAE e a existência no mercado de diversos fornecedores, os inconvenientes descritos acima foram reduzidos. Atualmente,

nos sistemas de micro-CLAE podem-se realizar separações a reduzidas vazões de FM, com elevada repetibilidade e exatidão, inclusive com a aplicação nas validações de métodos analíticos.

1.3.3. Temperatura

O aquecimento da coluna geralmente diminui a viscosidade da FM, reduzindo dessa forma a pressão necessária, permitindo um fluxo mais rápido. O aumento da temperatura, geralmente, diminui o tempo de retenção e melhora a resolução através do aumento da velocidade de difusão das substâncias, entretanto, o aumento da temperatura pode degradar a FE e reduzir o tempo de vida da coluna⁴, além de degradar analitos termolábeis. Quando a temperatura de uma coluna não é controlada, ela flutua com a temperatura ambiente, sendo, desta forma, necessário o controle para que se tenha repetibilidade nos tempos de retenção das análises.

1.4. Métodos físicos e químicos de caracterização da FE

Métodos espectroscópicos, termogravimétricos e físico-químicos são frequentemente empregados para caracterização da FE, pois fornecem informações importantes do material modificado quimicamente^{14,23}.

Uma caracterização estrutural extensiva da FE pode ser realizada pelo uso combinado das técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, RMN, revelando informações valiosas sobre a variedade e quantidade das espécies formadas nas reações de modificação da superfície da sílica⁴².

A técnica de RMN de ²⁹Si é realizada com o intuito de avaliar possíveis alterações químicas causadas na superfície do suporte de sílica após a ligação do silano. A sílica pode ser modificada com silanos mono, di ou trifuncionais e, de acordo com o tipo de silano usado, diferentes modificações podem ser obtidas. Essas modificações podem ser distinguidas por espectroscopia de RMN ²⁹Si.

O espectro típico de RMN ²⁹Si da sílica apresenta três sinais, Q² devido aos grupos silanóis geminais, Q³ referentes aos silanóis livres e vicinais e Q⁴ relacionados aos grupos siloxanos⁴³, Figura 6.

A sílica modificada com silano monofuncional apresenta a espécie M₁, enquanto que a sílica modificada com silanos di- e trifuncionais apresentam outras espécies de silício na

superfície da sílica. O efeito do processo de capeamento com hexametildissilazano ou trimetilclorossilano, reagentes comumente empregados para esta finalidade, também pode ser visto nos espectros de RMN ^{29}Si e ^{13}C ^{44,45}, pela introdução de uma nova espécie de silício $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, M_2 , que apresenta, geralmente, o mesmo sinal da espécie M_1 .

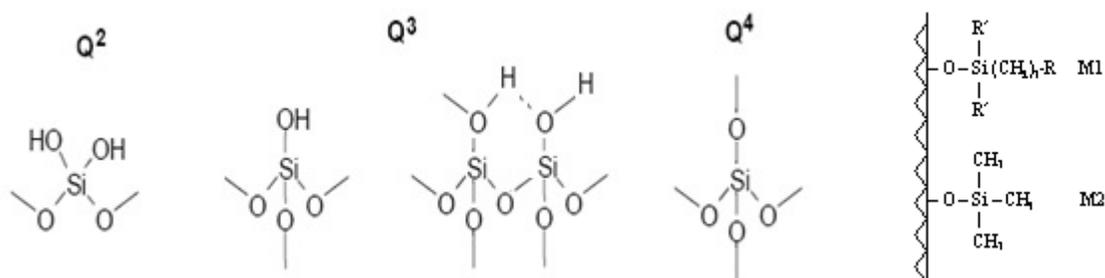


Figura 6 - Espécies de silício presentes na sílica (Q^2 , Q^3 , Q^4) e espécies presentes na sílica modificada (M_1 e M_2).

Os resultados obtidos a partir da análise elementar são úteis para a determinação da porcentagem de carbono após a etapa de imobilização, avaliando-se, desta forma, o grau de recobrimento efetivo do suporte⁴⁶.

A espectroscopia de absorção no infravermelho pode ser aplicada na avaliação qualitativa da presença de grupos funcionais característicos do agente sililante na FE^{23,47}.

1.5. Caracterização Cromatográfica

O amplo uso de fases reversas levou a introdução de diferentes FE, de alta qualidade que, juntamente com um grande número de ferramentas para controle e otimização das separações, contribuíram para a sólida popularização da CLAE-FR. Entretanto, as várias centenas de fases reversas, em muitos casos nominalmente idênticas, disponíveis atualmente, dificultam a seleção de uma melhor coluna para um problema específico de separação. Para que a seleção da coluna contendo a FE apropriada para a separação em questão, não se torne um problema, uma completa caracterização da FE é extremamente desejável para diferenciar características aparentemente similares. Os parâmetros cromatográficos avaliam a qualidade, as características e a viabilidade analítica das fases com base em interações intermoleculares entre o analito, a FE e a FM, sem a destruição da coluna.

1.5.1 Parâmetros Cromatográficos

O desempenho da coluna pode ser determinado pelos cálculos dos parâmetros cromatográficos, como: eficiência (expressa em números de pratos por metro – $N\ m^{-1}$); fator de assimetria do pico calculado a 10 % da sua altura (A_s); fator de retenção (k) e resolução entre picos adjacentes (R_s)^{8,17}. Estes valores são obtidos a partir do cromatograma resultante da separação de determinados compostos, como visualizado na Figura 7.

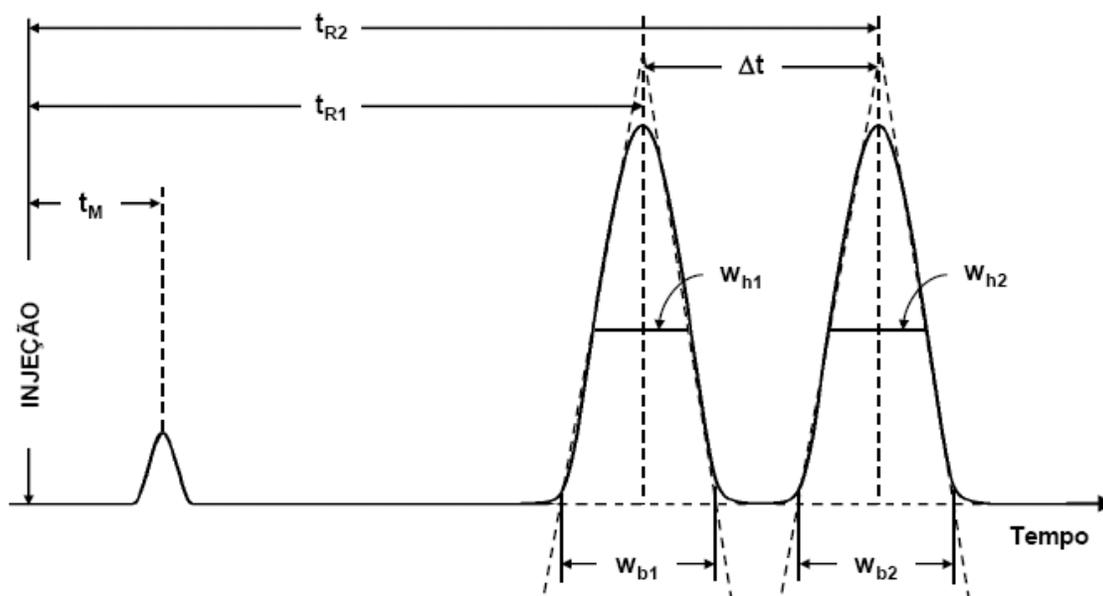


Figura 7 - Cromatograma e suas informações cromatográficas.

onde t_R é o tempo de retenção do analito, Δt a diferença entre os tempos de retenção para dois compostos, w_h o valor da largura do pico medido a meia altura, w_b é a largura do pico medido à linha de base entre as tangentes traçadas lateralmente ao pico⁸.

O tempo de retenção de um soluto (t_R) é definido como o tempo que o composto fica retido no sistema cromatográfico, medido desde o momento da injeção até o ponto máximo do pico. O tempo de retardamento ou o tempo de retenção de um composto não retido pela FE (t_M), em CLAE-FR, normalmente é medido para a uracila. O tempo que um composto permanece retido na FE (t'_R) pode ser obtido pela diferença entre o tempo total gasto pelo composto no sistema cromatográfico e o tempo em que ele se encontra na FM, $t'_R = t_R - t_M$ e é denominado de tempo de retenção ajustado. O fator de retenção (k) de um composto fornece informações a respeito da hidrofobicidade da FE e do grau de

recobrimento do suporte cromatográfico. O fator de retenção pode ser calculado pela razão do tempo que o composto se encontra retido na FE pelo tempo que ele está presente na FM, como sugere a Equação 1^{8,17}. Idealmente, os valores de k devem ficar entre 1,0 e 10,0.

$$k = \left(\frac{t_R - t_M}{t_M} \right) = \frac{t'_R}{t_M} \quad \text{Equação 1}$$

A resolução (Rs) expressa a separação entre dois compostos adjacentes. O valor de Rs é determinado de acordo com a Equação 2.

$$Rs = 1,17 \left[\frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{h1} + w_{h2})} \right] \quad \text{Equação 2}$$

onde os índices 1 e 2 se referem aos picos adjacentes no cromatograma. Valores de Rs acima de 1,5 apontam uma boa separação dos compostos, pois é um indicativo de ocorrência de separação até a linha de base¹⁷.

Uma outra medida da separação de dois componentes consecutivos é o fator de separação, α . Ele é calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção que, por sua vez, são relacionados aos tempos de retenção ajustados, Equação 3.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad \text{Equação 3}$$

Um outro termo, retenção relativa $r_{i:st}$, envolve a razão dos tempos de retenção ajustados do componente (i) e de um padrão (st), respectivamente. A retenção relativa é também usada para identificação de substâncias que pode ser calculada para quaisquer picos nos cromatogramas, livre de restrição de serem adjacentes.

A eficiência da coluna cromatográfica é medida em termos de número de pratos gerados. Um prato pode ser considerado equivalente a uma etapa de equilíbrio entre as duas fases. Quanto maior o número de pratos, mais equilíbrios existirão e maior será a eficiência e, portanto melhor a separação. A eficiência é calculada através da Equação 4.

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad \text{Equação 4}$$

onde t_R é o tempo de retenção do soluto e w_h é a largura do pico a meia altura.

Para se ter confiança nos valores de números de pratos deve-se calcular o fator de assimetria de um pico (As) a 10 % de sua altura. Este é um parâmetro que permite avaliar o grau de interação entre o suporte cromatográfico e os compostos que se deseja separar. O fator de assimetria é calculado de acordo com a Figura 8. O fator de assimetria deve estar compreendido na faixa de 0,9 a 1,2 sendo que valores de até 2,0 são aceitos⁵. A Equação 5 é usada para calcular o fator de assimetria.

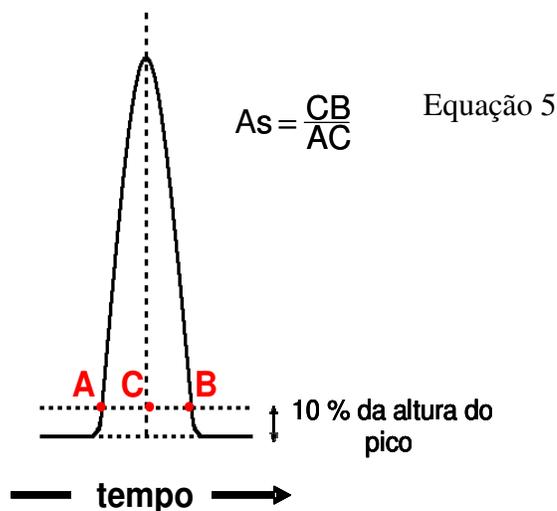


Figura 8 - Medida e cálculo do fator de assimetria.

O fator de alargamento (TF), equação 6, também é usado por alguns softwares para o cálculo da simetria do pico. A partir do cromatograma apresentado na Figura 8, pode-se

calcular a 5% da altura do pico os termos AB e AC descritos abaixo para ser obtido o valor de TF.

$$TF = \frac{AB}{2 \times AC} \quad \text{Equação 6}$$

onde AB é a largura do pico a 5% da altura e AC é a largura correspondente ao tempo do início do pico, medido a 5% de altura, até o tempo de retenção.

Os critérios de aceitação para os parâmetros cromatográficos avaliados de acordo com US-FDA, estão descritos na Tabela 1^{5,17,48-50}.

Tabela 1: Parâmetros cromatográficos de conformidade do sistema.

Parâmetros cromatográficos	Critérios de aceitação
Fator de retenção (k)	O pico deve estar bem separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um composto não retido t_M , $1 > k > 10$
Resolução (R_s)	$R_s > 1,5$ entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza, produto de degradação)
Fator de alargamento (TF)*	$TF \leq 2$
Número de pratos	Em geral deve ser > 2000 para CLAE

* também pode ser usada a avaliação do fator de assimetria A_s ($0,8 \geq A_s \leq 2,0$)⁵.

A eficiência também pode ser calculada através da altura equivalente a um prato H , podendo ser calculada através da Equação 7, na qual N corresponde ao número de pratos e L é o comprimento da coluna. A velocidade linear, μ , é calculada através da equação 8, onde t_M é o tempo de retenção de um composto não retido pela FE.

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Equação 7}$$

$$\mu = \frac{L}{t_M} \quad \text{Equação 8}$$

Em um processo de separação eficiente, um elevado número de pratos é necessário, para isso um enchimento uniforme é essencial. Isto requer uma coluna recheada com procedimento bem definido a fim de eliminar variações na porosidade do leito, pois quando uma coluna cromatográfica não está uniformemente recheada pode ocorrer aumento no número de H .

Segundo Snyder e Kirkland¹⁷, o principal objetivo na separação cromatográfica é a obtenção de pequenos valores de H com elevada eficiência de separação. O valor de H é menor em colunas recheadas com partículas pequenas, para reduzidas taxas de vazão de FM; para FM menos viscosa, para separações realizadas em maiores temperaturas; e para moléculas pequenas de soluto.

O valor de H para uma coluna cromatográfica também pode ser expresso através da equação de van Deemter, Equação 9. Nessa equação, u representa a velocidade linear da FM, e A , B e C são constantes cinéticas determinadas experimentalmente e que incluem os efeitos de difusão turbilhonar, difusão longitudinal e transferência de massa, respectivamente.

$$H = A + \frac{B}{u} + \mu C \quad \text{Equação 9}$$

O termo A da Equação 9, chamado de difusão turbilhonar, refere-se aos diversos caminhos percorridos pelas moléculas de um composto ao atravessarem a coluna cromatográfica. As moléculas que entram ao mesmo tempo na coluna podem ser eluídas em diferentes tempos, ocasionando alargamento do pico cromatográfico.

O segundo termo da equação de van Deemter B está relacionado à difusão longitudinal, na qual o soluto difunde do centro de maior concentração do pico para regiões mais diluídas. O efeito se torna mais pronunciado quando aumenta o tempo de residência do soluto na coluna. Quanto mais rápido a vazão da FM, menor o tempo que o soluto fica na coluna e ocorre menor alargamento difusivo.

A transferência de massa, referente ao terceiro termo da Equação 9, é proveniente do limite de tempo necessário para o soluto estar em equilíbrio entre as fases móvel e estacionária. A transferência de massa é reduzida quando a espessura da FE que recobre o suporte é menor, pois diminui o tempo para o soluto se difundir mais rápido a partir de

profundidades mais distantes da FE para dentro da FM. Quanto maior for o tamanho da partícula da FE e mais viscosa for a FM, maior será a velocidade de transferência de massa.

O H fornece uma interpretação física simples dos efeitos de dispersão axial e de resistência à transferência de massa sobre o desempenho da coluna. A Figura 9 apresenta uma curva hipotética da variação de H com a velocidade linear da FM (μ). A curva representa, na prática, um modo de selecionar a vazão ótima de uma corrida cromatográfica. Na Equação 9 o primeiro termo, representado pela curva A, é independente da velocidade superficial. A dispersão devido à transferência de massa incompleta é uma função linear de μ e é representada pela curva C. A dispersão longitudinal é inversamente proporcional a velocidade linear e é representado pela curva B. A curva superior representa o perfil resultante de H versus μ . Esta curva apresenta um valor mínimo para altura dos pratos ($H_{\text{mínimo}}$) a uma dada velocidade linear ótima ($\mu_{\text{ótimo}}$). Abaixo desta velocidade, H é fortemente dependente dos efeitos de difusão (termo B) e a altas velocidades é fortemente dependente do termo de transferência de massa (termo C)⁵¹.

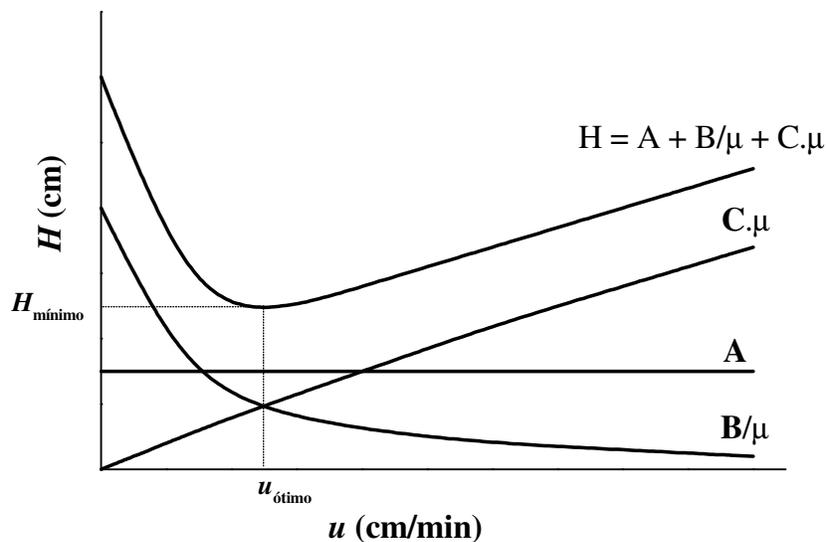


Figura 9 – Curva de van Deemter hipotética, mostrando a variação entre a altura de prato (H) com a velocidade linear da FM (μ).

1.5.2 Testes de avaliação cromatográfica

Os métodos físico-químicos empregados na avaliação das FE se fazem necessários para um melhor conhecimento das características superficiais destas fases, porém, embora relevantes, são insuficientes para a prática cromatográfica. Complementando, testes empíricos simples e de caráter universal foram desenvolvidos para avaliar e especificar interações discretas entre os compostos de interesse, a FE e a FM.

Os testes de avaliação cromatográfica permitem a comparação das propriedades de eficiência, retenção, hidrofobicidade, seletividade estérica, atividade silanofílica, capacidade de troca iônica e habilidade de formar ligações de hidrogênio de uma determinada fase em relação a uma outra em específico, ou, em relação aos valores encontrados na literatura.

Os testes cromatográficos mais conhecidos e frequentemente empregados foram sugeridos por Engelhardt e Jungheim⁵², Tanaka e colaboradores⁵³ e Neue *et al.*⁵⁴, que, além da simplicidade e da possibilidade de comparar FE aparentemente idênticas, também contribuem para um entendimento mais detalhado da retenção e seletividade em CLAE-FR. Estes autores propuseram misturas testes bastante simples, que, quando analisadas em fases móveis adequadas, fornecem informações relevantes sobre as propriedades e a conveniência analítica da FE.

Além das misturas testes citadas acima, neste trabalho, as colunas foram avaliadas cromatograficamente com base na separação dos compostos de duas misturas testes comumente empregadas no Laboratório de Cromatografia Líquida do Instituto de Química da Unicamp (Labrom). A primeira mistura, constituída de compostos neutros de polaridades variadas (uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno) foi empregada para avaliação da seletividade e hidrofobicidade das FE. A segunda mistura, constituída por compostos ácido, básico e neutros (uracila, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafteno) foi empregada para avaliação da interação dos analitos, principalmente básicos, com o suporte cromatográfico. Estas informações são obtidas pelo tempo de retenção e pelo fator de assimetria de pico destes compostos.

1.5.2.1 Mistura teste de Engelhardt

A mistura teste de Engelhardt Jungheim⁵² é constituída de compostos com estruturas e propriedades químicas diferentes que são úteis na avaliação cromatográfica

de uma FE. Os compostos que compõem a mistura são: uracila, anilina, fenol, N,N-dimetilanilina, tolueno e etilbenzeno.

A partir do fator de separação entre os compostos etilbenzeno e tolueno avalia-se a hidrofobicidade da coluna. Este valor é obtido pela razão entre os fatores de retenção do etilbenzeno e do tolueno ($\alpha_{CH_2} = k_{\text{etilbenzeno}} / k_{\text{Tolueno}}$), que diferem entre si por um grupo CH_2 , também denominada de seletividade metilênica. O valor de α_{CH_2} fornece informações a respeito da hidrofobicidade das FE. Outra avaliação obtida com a mistura de Engelhardt é a atividade silanofílica. A atividade dos silanóis residuais pode ser medida pelo fator de assimetria do pico da N,N-dimetilanilina a 10 % de sua altura e também pela ordem de eluição dos compostos básicos (anilina e N,N-dimetilanilina). Segundo Engelhardt e Jungheim⁵², em uma coluna com baixa atividade dos silanóis residuais, a anilina deve eluir antes do fenol e a N,N-dimetilanilina deve ser eluída antes do tolueno. Além disso, a razão entre os fatores de assimetria para o pico da anilina e do fenol deve ser inferior a 1,3⁵².

1.5.2.2 Mistura teste de Tanaka

A mistura teste elaborada por de Tanaka e colaboradores⁵³ é muito útil na avaliação da qualidade da FE. As principais propriedades da FE avaliadas com estas misturas foram:

□ Hidrofobicidade ou seletividade hidrofóbica (α_{CH_2}): Medida pela razão dos fatores de retenção do pentilbenzeno e do butilbenzeno, $\alpha_{CH_2} = k_{PB} / k_{BB}$. Esta é uma medida do recobrimento superficial da fase, pois a seletividade entre alquilbenzenos, diferenciados por um grupo CH_2 , é dependente da quantidade de polímero imobilizado.

□ Seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$): Medida pela razão entre os fatores de retenção do trifenileno e da *o*-terfenila, $\alpha_{T/O} = k_T / k_O$. O $\alpha_{T/O}$ é uma medida da seletividade estérica, a qual é influenciada pelo espaçamento dos ligantes e também pela funcionalidade do polímero.

□ Capacidade de ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/P}$): Esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol, $\alpha_{C/P} = k_C / k_P$. O $\alpha_{C/P}$ é uma medida do número de grupos silanóis disponíveis para formarem ligações de hidrogênio com os constituintes da amostra.

□ Capacidade de troca iônica total ($\alpha_{B/P}$ pH 7,6): Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/P}$ pH 7,6 = k_B / k_P . O valor obtido é uma estimativa da atividade silanofílica total da FE.

□ Capacidade de troca iônica em meio ácido ($\alpha_{B/P}$ pH 2,7): Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/P}$ pH 2,7 = k_B / k_P . O valor obtido é uma estimativa da acidez dos grupos silanóis residuais.

1.5.2.3 Mistura teste de Neue

A mistura teste de Neue *et al.*⁵⁴ é constituída pelos compostos uracila, usado para determinar o tempo de retenção de um composto não retido na FE, naftaleno e acenafteno como compostos hidrofóbicos para avaliar a eficiência da separação e o cloridrato de propranolol e cloridrato de amitriptilina como compostos básicos. Esses dois últimos compostos são de importância industrial, muito utilizados em medicamentos, sendo que a amitriptilina apresenta $pK_a > 9,4$. Os compostos altamente básicos podem interagir com os grupos silanóis residuais presentes na superfície da sílica modificada, resultando em picos com tempos de retenção elevados e assimétricos. Dessa forma, a mistura teste de Neue é muito útil na avaliação e comparação de FE quanto à presença de silanóis residuais e também com relação à eficiência de separação.

1.5 Estabilidade

As FE com suporte de sílica são geralmente estáveis no intervalo de pH entre 2 a 8. Muitos dos métodos encontrados nas farmacopéias^{5,55,56} descrevem condições cromatográficas com pH nos extremos da faixa de estabilidade da sílica. Nessa faixa de pH, as FE utilizadas em FR apresentam uma vida útil da coluna reduzida. Outra questão relevante é com relação à separação de compostos básicos que podem ter sua separação prejudicada pela interação com os silanóis residuais presentes na FE. A pesquisa envolvendo novas FE com grupo polar embutido tem buscado FE que apresentem melhor estabilidade frente à FM tamponada e separações mais eficientes para compostos básicos²³. A estabilidade das FE quimicamente ligadas, com suporte de sílica, está relacionada com a pureza da sílica em relação à presença de metais, com o tipo da fase

usada e somada a isto, com as condições cromatográficas da separação (pH, concentração de tampão na FM e a temperatura de separação).

A vida útil de uma coluna está relacionada com os cuidados técnicos relacionados à análise, com os tipos de compostos a serem separados, tipo de matriz e condições cromatográficas. Em diversas ocasiões, quando é percebido que uma coluna apresenta baixa eficiência de separação para um dado composto, verifica-se se foram tomadas as devidas precauções e cuidados básicos no uso da coluna, como, por exemplo, passar água para retirar os resquícios da FM tamponada, estocar a coluna no solvente original de enchimento e se foram evitadas alteração no sentido de fluxo da FM, uso de temperatura e de vazões elevadas. Todos esses fatores isoladamente ou unidos podem causar, além da solubilização da sílica, a perda de eficiência, redução no fator de retenção, diminuição da resolução e aumento do fator de assimetria. Em outras ocasiões, quando as condições acima são bem estabelecidas e atendidas, faz-se necessário uma avaliação da estabilidade da coluna devido a FE usada no recheio. Há alguns procedimentos descritos na literatura para avaliação da coluna^{57,58} e, neste trabalho, optou-se pelo uso da mistura teste de Neue⁵⁴ por conter um conjunto entre FM e mistura de compostos, que permitem avaliar as propriedades da FE Si-C8-uréia.

2. Importância da Análise de Fármacos

2.1 Avaliação do mercado farmacêutico

O setor farmacêutica brasileiro vem a cada ano ocupando posição de destaque na área produtiva do país. Atualmente, há um grande investimento na área farmacêutica em comparação com outras áreas da indústria nacional. A tendência das indústrias farmacêuticas em direção a maiores investimentos começou em 1999, com a promulgação da Lei dos Genéricos, Lei nº 9.787, quando ocorreu o maior crescimento das empresas nacionais. Os genéricos são cópias de medicamentos inovadores, cujas patentes já expiraram.

O mercado mundial de genéricos cresce aproximadamente 17% ao ano e movimentada cerca de US\$ 80 bilhões, com crescimento previsto para 2012 em torno de US\$120 bilhões. No mercado mundial, os Estados Unidos têm especial destaque, com vendas de genéricos da ordem de US\$ 33 bilhões⁵⁹.

A consultoria IMS-Health (Serviços de Marketing Intercontinental-Saúde) informou que o mercado global farmacêutico deverá movimentar em 2010 entre US\$ 820 bilhões e US\$ 830 bilhões, um crescimento de 4% a 6% em relação a 2009. Nos últimos cinco anos, as vendas globais das indústrias cresceram cerca de 40%. A expectativa é que até 2013 o mercado brasileiro cresça entre 8% e 11%. O Brasil deverá ficar em 8ª posição no mercado global farmacêutico nos próximos três anos, avançando uma posição no ranking comparado a 2003. As políticas dos governos a favor dos produtos genéricos e a expiração de patentes de remédios de marca são alguns dos fatores responsáveis por esse avanço⁶⁰.

O mercado de medicamentos genéricos registrou crescimento de 19,4% em 2009. As empresas do setor comercializaram 330,9 milhões de unidades frente as 277,1 milhões comercializadas no ano anterior. As vendas do produto movimentaram R\$ 4,5 bilhões no período, o que representa alta de 24% em relação a 2008, quando as vendas somaram R\$ 3,6 bilhões. Esses números mostram que o mercado de genéricos cresceu 2,3 vezes acima da média do mercado farmacêutico total em unidades em 2009. No ano passado, o conjunto da indústria farmacêutica brasileira comercializou 1,769 bilhão de unidades de medicamentos no período contra 1,634 bilhão em 2008, o que representa alta de 8,2%⁶¹. A Figura 10 apresenta o gráfico da evolução de mercado de genéricos no Brasil entre o mês de Janeiro de 2009 a dezembro do mesmo ano⁶¹.

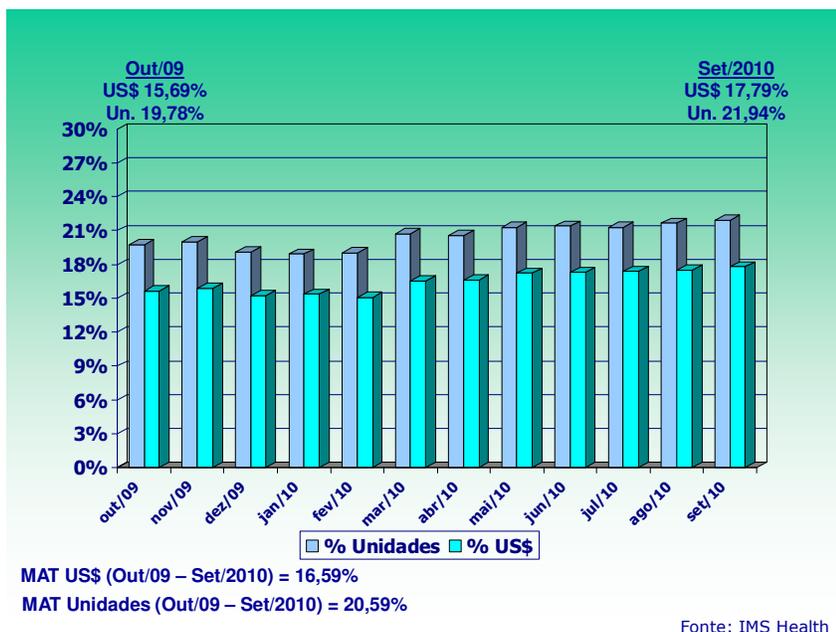


Figura 10 – Evolução do mercado de genéricos no Brasil de outubro de 2009 a setembro de 2010, comparado aos Estados Unidos (Adaptado⁶¹).

Entre as áreas de investimento no ramo das indústrias farmacêuticas, o setor de pesquisa e desenvolvimento (P&D) tem recebido amplo investimento tanto do Governo Federal, através de projetos, quanto de recursos das próprias empresas. Este setor é responsável pelo lançamento de novos genéricos no mercado farmacêutico, sendo essencial no crescimento da empresa.

Os resultados de uma pesquisa realizada no primeiro semestre de 2008 pela Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica (Febrapharma) mostram que, de 2006 para 2007, os investimentos em P&D das empresas nacionais cresceram 68%, enquanto os das multinacionais cresceram 11%. A pesquisa constatou que as companhias planejavam investir R\$ 1,72 bilhão até o final de 2008, 14,8% a mais do que em 2007. O estudo estimou que R\$ 505,26 milhões seriam destinados a P&D, um aumento de 30,08% em relação a 2007 e de 67% em comparação com 2006⁶². Os recursos para P&D iriam para pesquisa clínica e inovação, com foco incremental basicamente em projetos para modificações de substâncias já conhecidas, buscando maior eficácia ou segurança. As empresas farmacêuticas nos Estados Unidos e nos países europeus investiram, em média, 20% de seu faturamento em P&D. No Brasil, esse número foi de 5,3% no ano de 2009, quando o faturamento da indústria farmacêutica somou R\$ 28,12 bilhões⁶³.

2.2 Análise de Fármacos

A análise de medicamentos, realizada nos laboratórios das indústrias farmacêuticas bem como em laboratórios do governo como o Instituto Adolfo Lutz, referência nacional em avaliação de medicamentos, tem o intuito de avaliar e garantir a qualidade do produto que está sendo colocado à disposição da população.

A falsificação e a adulteração de medicamentos têm sido divulgadas constantemente pela mídia brasileira. É comum ouvir dizer que foi encontrada uma empresa de “fundo de quintal” que manipulava medicamento sem autorização da Secretaria de Vigilância Sanitária ou que foi encontrado um caminhão cheio de medicamentos roubados. Estas adulterações podem ser desde a substituição do fármaco por placebos e por outros compostos, não comuns à formulação, até alteração do rótulo e embalagens primárias e secundárias do medicamento. Este tipo de adulteração é muito comum em farmácias de manipulação não idôneas. Markman *et al.*⁶⁴ avaliaram a conformidade farmacopeica de cápsulas de sinvastatina manipuladas em farmácias das cidades de São Paulo e de

Campinas e verificaram que, entre as amostras analisadas, 18 apresentaram o ensaio de dissolução insatisfatório e 15 amostras foram insatisfatórias no ensaio de uniformidade de conteúdo.

O setor de análises de um laboratório de pesquisa analítica e controle de qualidade dispõe de diversas tecnologias para avaliar a qualidade dos medicamentos, desde a preparação da amostra, por exemplo, em um sistema líquido-líquido, para separar um composto mais solúvel em determinado solvente, até a detecção e quantificação de impurezas em equipamentos avançados como o cromatógrafo a líquido acoplado ao espectrômetro de massas⁶⁵.

No Brasil, alguns produtos farmacêuticos são analisados por metodologias analíticas, contidas nos compêndios oficiais^{5,55,56,66}, que não apresentam seletividade adequada para identificar e quantificar os compostos de degradação e impurezas provenientes da síntese. Alguns fármacos possuem impurezas, oriundas da síntese ou da degradação do fármaco, quando exposto às condições de estresse, as quais algumas das metodologias descritas nas farmacopéias não são capazes de quantificar. Os métodos titulométricos não devem ser usados nestes casos, pois não apresentam seletividade para análise do composto de interesse.

Os compêndios oficiais descrevem métodos analíticos para análise de fármacos que devem ser práticos, rápidos e que atendam a rotina de um laboratório de controle de qualidade. Na indústria farmacêutica brasileira são usados principalmente os métodos potenciométricos, espectrometria de absorção no UV-VIS, espectroscopia de absorção no infravermelho próximo e médio, eletroforese capilar, cromatografia a gás (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Entre eles, a CLAE tem sido o método mais utilizado pelas indústrias farmacêuticas por ser rápido, preciso e seletivo, capaz de separar e detectar o composto ativo dentre muitos outros presentes na formulação⁶⁷.

Os detectores mais usados em CLAE são os de absorção no ultra-violeta, eletroquímico, arranjo de diodo, fluorescência e espectrometria de massas⁶⁷. A CLAE com a utilização do detector por espectrometria de massas é dita uma técnica universal e tem sido amplamente empregada tanto em instituições públicas e centro de pesquisa como nos laboratórios de P&D das indústrias farmacêuticas. Os demais detectores são amplamente usados nas indústrias, sendo o detector por arranjo de diodos o mais utilizado para a área de desenvolvimento analítico, por permitir a aquisição dos dados nas regiões do

ultravioleta e visível, além de fornecer a pureza do pico e informações qualitativas e quantitativas.

Como exemplo de classe de fármacos analisados, pode-se citar os benzodiazepínicos que são compostos que possuem uma estrutura química comum com dois anéis aromáticos e um anel heterocíclico. Esses compostos, na forma de substância pura, são determinados, em sua grande maioria, por métodos potenciométricos. Entretanto, quando o composto é analisado em produtos farmacêuticos, o método potenciométrico não é seletivo o bastante, pois responde a vários excipientes contidos na formulação. Nesse caso, a utilização de cromatografia é uma alternativa eficiente para separar os compostos de interesse a partir de uma matriz complexa. Os métodos existentes nas farmacopéias, para determinação do teor desses compostos, descrevem condições e colunas cromatográficas que, algumas vezes, não atendem ao requisito da rotina de análise de um controle de qualidade da indústria farmacêutica⁶⁸. Esses métodos mencionam o uso de FR sem qualquer tipo especial de tratamento para minimizar a interação com os silanóis residuais. Como os benzodiazepínicos são compostos básicos que têm a separação por CLAE em fase reversa dificultada pela forte interação com os grupos silanóis residuais é de extrema importância a utilização de uma FE que minimize essas interações. A interação dos fármacos com o grupo silanol residual pode ocasionar uma retenção com alargamento de pico, reduzindo a eficiência da separação e o tempo de vida útil da coluna.

3. Desenvolvimento de Métodos e Validação

No desenvolvimento de uma nova metodologia analítica por CLAE devem ser consideradas as questões já discutidas no item 1.2. Considerando que no presente trabalho foi utilizada a coluna contendo a FE Si-C8-uréia, inicialmente foi feito um estudo da separação dos fármacos avaliando os parâmetros de conformidade^{5,17,48-50}, fator de retenção (k), resolução (R_S), fator de separação (α), fator de alargamento (TF) e número de pratos (N) obtidos em separações isocrática e por gradiente, para selecionar as melhores condições cromatográficas de separação. Para que seja obtida uma melhor condição de separação, os seguintes itens devem ser avaliados no desenvolvimento^{4,17,69}:

- composição da FM: adição de tampão em diferentes concentrações, tipos e proporções; alteração de modificadores orgânicos;

- tipo de eluição: isocrática ou gradiente;
- método de quantificação: padronização externa, interna, adição por padrão
- estudo de diferentes matrizes: sólida, semi-sólida e líquida;
- temperatura da coluna;
- volume de injeção no sistema CLAE;
- comprimento de onda de melhor absorção, com pureza de pico adequada;

Outros fatores importantes que devem ser considerados no desenvolvimento do método são os problemas relacionados ao cromatograma como picos assimétricos ou alargados, picos artefatos, picos negativos, variação do tempo de retenção, reações químicas durante a separação resultando em anomalias⁶⁹. Geralmente esta distorção do pico irá acarretar em baixa resolução e até em coeluições indesejadas, comprometendo o método proposto. Estas ocorrências no cromatograma podem estar relacionadas, por exemplo, ao uso de uma coluna não adequada, a existência de sítios secundários de retenção ou mais fortemente retentivos, solvente com força inadequada para a amostra, sobrecarga de amostra e tampões inadequados^{69,70}.

A partir das características e propriedades da amostra, as demais partes integrantes para a realização da análise são determinadas para a otimização das condições analíticas. Alguns questionamentos à respeito da amostra devem ser feitos. Por exemplo, para o desenvolvimento de métodos para análise de fármacos na indústria farmacêutica é necessário saber qual solvente ou mistura deles será usado para solubilizar a amostra; qual a estabilidade da amostra; qual o tipo do meio ou matriz em que a amostra está presente: líquido (xarope, solução, suspensão), sólido (comprimido, cápsulas) e semi-sólidos (pomada, creme e gel); qual a concentração do composto de interesse na amostra; quais os procedimentos que devem ser usados na extração do composto ativo; quais as membranas filtrantes que não retêm o ativo; qual a faixa de absorção do composto de interesse; qual o valor de pKa ou pKb do analito, solubilidade, volatilidade, polaridade⁷¹ e quais as propriedades do analito que permitem escolher o tipo de detector a ser usado. Ainda com relação à amostra, a seleção adequada de uma técnica de preparo de amostra é um fator chave na obtenção de resultados confiáveis e exatos⁷¹. Esta escolha, depende das condições já descritas, entretanto, para matrizes complexas como fluídos biológicos, matrizes naturais como extrato de plantas e produtos farmacêuticos em que o ativo está em baixa concentração, como as vitaminas em produtos de suplemento vitamínico e

mineral, faz-se necessário o uso de técnicas de extração diferenciadas. A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica que tem auxiliado no desenvolvimento de métodos para extração dos ativos dessas matrizes complexas por apresentar vantagens como menor consumo de solvente, facilidade de automação, menor geração de resíduos, capacidade do aumento da concentração do analito e disponibilidade de diversos sorventes⁷¹. Apesar dos cartuchos apresentarem alto custo e, em algumas análises, o tempo de preparo ser elevado e também a faixa de recuperação estar no intervalo de 70-120%⁷¹, sendo que para análise de produto farmacêutico o recomendado é de 90-110%, a EFS ainda é uma alternativa prática para os problemas relacionados à matriz complexa.

Em se tratando de matéria-prima pura e também de produtos farmacêuticos que passarão pelo estudo de estabilidade acelerada, é importante salientar a necessidade de verificar interferentes como impurezas, oriundas da própria síntese do composto, conhecidas como compostos relacionados e de produtos de degradação, originados de rotas de degradação ácida, básica, oxidativa, térmica e fotolítica⁷².

3.1 Validação

Algumas verificações precisam ser realizadas para garantir que as características de desempenho de um método sejam entendidas e para mostrar que o método seja cientificamente coerente, sob as condições nas quais ele deve ser aplicado. Essas verificações são conhecidas como validação. A validação do método assegura a credibilidade do mesmo quando ele é colocado em uso na rotina de um laboratório, pois passa por uma avaliação sistemática do procedimento analítico para estabelecer as reais condições nas quais deve ser aplicado e que suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico^{49,73-76}.

A validação do método inicia com a criação do protocolo de validação, no qual é descrito o planejamento da estratégia analítica, etapas de análise e especificações. Na área farmacêutica, as validações são conduzidas conforme o que preconiza a Resolução da ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003⁷⁴ e os guias ICH Q2A⁷⁷ e Q2B⁷⁸. O documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003⁷⁹ também é usado como referência.

No Brasil, para registro de um medicamento genérico, é exigido por parte da ANVISA, além de outros documentos e testes, a validação da metodologia analítica seguindo os

parâmetros descritos na RE 899/03⁷⁴ e a validação parcial^{80,81} desta metodologia pelo Centro de Equivalência Farmacêutica, certificado por esse mesmo órgão público. Entretanto, na validação parcial não são exigidos todos os parâmetros avaliados na validação. Os parâmetros necessários são os itens: linearidade, intervalo linear, precisão, exatidão e especificidade.

A Tabela 2 apresenta as principais figuras de mérito a serem avaliadas na validação de métodos e os critérios de aceitação⁷⁴.

Tabela 2 – Figuras de mérito e critérios de aceitação estudados na validação⁷⁴.

Figuras de Mérito	Critérios de aceitação
Especificidade / Seletividade	Nenhum pico deve eluir no tempo de retenção do composto em estudo. O pico do composto deverá ter elevada pureza.
Linearidade	Coeficiente de correlação maior que 0,99 para a curva analítica
Intervalo	Informativo
Precisão	O DPR das seis determinações no mesmo dia deverá ser menor que 5,0 %
Exatidão	A recuperação deverá estar entre 98,0 % a 102,0 % para cada concentração avaliada (3 níveis)
Limite de Detecção	Informativo
Limite de Quantificação	Informativo
Estabilidade	O teor da solução avaliada deverá estar entre 98,0 a 102,0 % em relação ao teor inicial da solução.
Robustez	Aceitação dos parâmetros cromatográficos para as alterações e avaliação do teor entre a condição alteradas e a controle.

Um parâmetro que não está descrito na resolução da ANVISA⁷⁴ é a interferência de membranas filtrantes na retenção de compostos, mas que apresenta significativa importância no preparo da amostra. A interferência de filtro é realizada para avaliar o

processo de filtração, a fim de evitar possíveis entupimentos da coluna e, principalmente, verificar se a filtração está retendo o analito de interesse^{82,83}. Neste parâmetro, o teor da solução filtrada em membrana de 0,45 µm ou 0,22 µm é comparado com teor obtido com a solução centrifugada. A recuperação entre os dois processos deve estar entre 98,0 % a 102,0 %.

Os principais parâmetros ou figuras de méritos, informados na Tabela 2 são discutidos individualmente a seguir⁷⁹⁻⁸⁸.

3.1.1 Especificidade e Seletividade

A seletividade de um método refere-se ao seu poder de determinar um analito específico numa mistura complexa sem a interferência de outros compostos. Ela avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas, produtos de degradação e de outros compostos.

Segundo a ANVISA⁷⁴, para a análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido) em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contêm o fármaco, mas compostos estruturalmente semelhantes. Com relação à análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) fortificadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não fortificadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo metodologia farmacopéica ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por ex. luz, calor, umidade, hidrólise ácida/básica e oxidação).

Na análise por métodos cromatográficos, devem-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos, calculados com auxílio do

detector por arranjo de diodos ou do espectrômetro de massas que são úteis para avaliar se o pico cromatográfico é atribuído a um só componente⁸⁴.

Neste contexto, um procedimento que pode ser adotado, baseado na resolução da ANVISA⁸⁰, é avaliar se no cromatograma obtido com o diluente, FM, placebo e placebo fortificado com outros ativos presentes na formulação aparecerem picos de interferentes que eluam no tempo de retenção do analito de interesse.

Ainda com relação ao estudo da seletividade do método, a ANVISA, através do Informe Técnico⁸⁵, e o ICH, através do guia Q3B⁸⁶ descrevem o procedimento do estudo de degradação, que avalia se o método a ser validado apresenta capacidade de separação do composto ativo frente a diversas substâncias que poderão surgir nas condições de degradação estudadas.

Os produtos de degradação são impurezas resultantes de alterações químicas que surgem durante a síntese do fármaco e/ou armazenamento do medicamento, causados pela luz, temperatura, pH, umidade, pela reação com um excipiente, e/ou pelo contato com a embalagem primária^{87,88}.

O estudo de estresse é realizado submetendo o medicamento, fármaco, diluente, FM e placebos às condições de estresse^{85,87-89} descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições de degradação e critérios de aceitação estudados na validação^{74,85}.

Condição	Critérios do teste
Aquecimento	60 °C
Umidade	75% de umidade relativa ou mais
Solução Oxidativa	3% H ₂ O ₂
Solução Ácida	HCl 0,1 mol L ⁻¹
Solução Básica	NaOH 0,1 mol L ⁻¹
Fotolítica	UV-B-fluorescente

O objetivo deste estudo é promover uma degradação do fármaco em uma faixa de 10% a 30% e não degradar o fármaco totalmente. Quando a degradação for menor que 10%, deve-se realizar o estudo em condições mais drásticas, como por exemplo, aumentando a temperatura, tempo de exposição ou utilizando soluções mais concentradas

de ácido, base ou peróxido. Se a degradação for maior que 30%, deve-se proceder de forma inversa, ou seja, reduzindo as condições de degradação. Na ausência total de degradação do composto após 10 dias, o fármaco é considerado estável.

3.1.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de concentração. É obtida através da correlação entre o sinal medido e a concentração do analito na amostra.

A ANVISA⁷⁴ recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. Para a análise de teor a faixa de concentração sugerida é de 80 a 120% da concentração em estudo. Para a análise de impureza a avaliação deve ser realizada do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado.

A relação linear é observada inicialmente pelo tratamento matemático de regressão linear, sendo que o valor mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r), deve ser de 0,99. Comprovada a relação linear, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente angular, intersecção com o eixo Y, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear, resíduo e desvio padrão relativo.

A análise dos resíduos revela se a presunção de normalidade da distribuição dos resíduos se confirma; pode revelar se a variância dos resíduos é realmente constante, ou seja, se a dispersão dos dados em torno da reta de regressão é uniforme, se há ou não uma variável não identificada que deve ser incluída no modelo⁹⁰. Os valores obtidos para o resíduo também mostram se a ordem em que os dados foram coletados (p. ex., tempo da observação) tem algum efeito ou se a ordem deve ser incorporada como uma variável no modelo e se a presunção de que os resíduos não são correlacionados está satisfeita. O resíduo (e_i) é determinado pela Equação 10.

$$e_i = Y_e - Y_t \quad \text{Equação 10}$$

onde,

Y_e = valor de y experimental

Y_t = valor de y obtido da transformação matemática

Na plotagem dos resíduos é avaliado se os dados atendem às premissas básicas, o gráfico deve mostrar uma faixa horizontal centrada em torno de 0, sem mostrar uma tendência positiva ou negativa^{90,91}. Se o gráfico é aproximadamente linear, pode-se assumir que os resíduos têm distribuição normal, os resíduos parecem aleatórios, sem padrão, Figura 11A.

Na análise do resíduo podem ser verificadas alterações na distribuição dos dados, indicando que, em alguns casos, o modelo linear não é o mais apropriado. Na Figura 11B é apresentado o gráfico de resíduos com variância residual crescente. Se o gráfico dos resíduos mostra uma tendência sistemática, positiva ou negativa, significa que uma outra função (não linear) deve ser escolhida, Figura 11C.

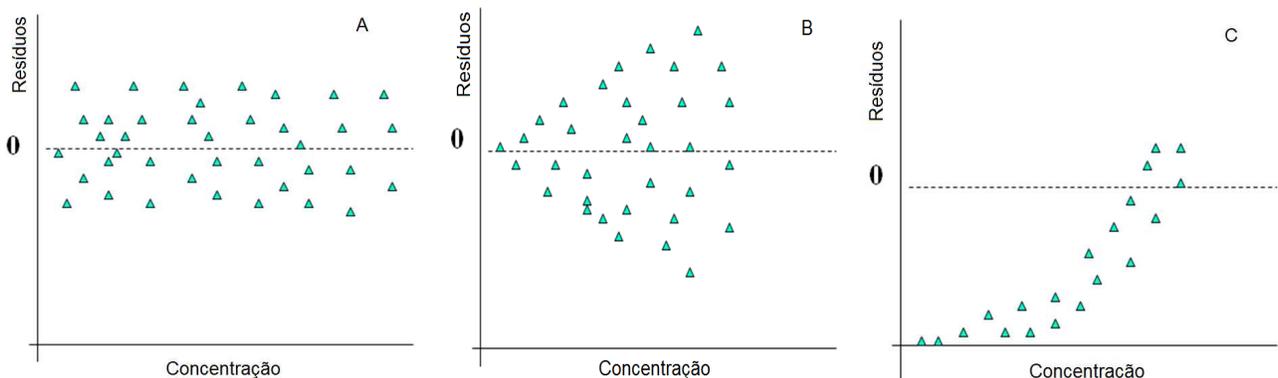


Figura 11 – Gráfico de resíduos: A distribuição normal; B variância residual crescente e C gráfico com tendência residual positiva. (Adaptado⁹¹)

A partir dos valores da área experimental pode-se calcular a concentração experimental e construir o gráfico das curvas obtidas experimentalmente e a resultante do tratamento matemático⁷⁴. O coeficiente de correlação obtido pela regressão linear deste gráfico indica que quanto mais próximo de 1, menor é a diferença entre os dados experimentais e teóricos.

A avaliação da proporcionalidade entre a concentração e a área é realizada pelo desvio padrão relativo das respostas relativas obtidas pela divisão dos dados dos sinais pelas respectivas concentrações. Um desvio padrão relativo menor que $< 2,0 \%$ tem sido utilizado na avaliação de curvas usadas na linearidade⁹².

Quanto aos métodos de quantificação, os mais utilizados são os da padronização externa e da padronização interna. O método de padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra, com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas, preparadas a partir de um padrão. Pode-se usar uma única solução padrão na mesma concentração da solução amostra, como na determinação da precisão, ou pode-se preparar soluções do composto a ser quantificado em diferentes concentrações abrangendo a concentração da solução amostra.

O método de padronização interna consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas do composto de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de uma substância chamada de padrão interno. À solução amostra também é adicionada a mesma quantidade conhecida do padrão interno. Através de uma razão entre as áreas obtidas pode-se calcular a concentração do analito na amostra. O padrão interno deve apresentar tempo de retenção próximo ao composto de interesse, ser similar e não reagir com este composto, além de não fazer parte da amostra. Este método é aplicado quando há pequenas variações no experimento, como temperatura da coluna, pois a variação ocorrerá tanto na amostra quanto no padrão, havendo, portanto, uma correção no cálculo⁹³.

3.1.3 Intervalo linear – Faixa linear

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados às amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo^{73,74}.

3.1.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD é a menor quantidade possível de ser detectada pelo método analítico sem a necessidade de exatidão da medida.

O LQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável. Pode ser determinado através do método visual, da relação sinal/ruído ou da curva analítica.

Os limites de detecção LD e de quantificação LQ são expressos em unidades de concentração, e são calculados através das Equações 11 e 12, respectivamente, DP_a corresponde à estimativa do desvio padrão do intercepto com o eixo y da curva analítica e b à inclinação da curva⁷⁴.

$$LD = \frac{3 \times DP_a}{b} \quad \text{Equação 11} \quad LQ = \frac{10 \times DP_a}{b} \quad \text{Equação 12}$$

O LQ também pode ser determinado por meio da relação sinal/ruído, Equação 13, onde H é a altura do pico e h a altura do ruído da linha de base próximo ao tempo de retenção do pico, Figura 12. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

$$S/R = \frac{H}{h} \quad \text{Equação 13}$$

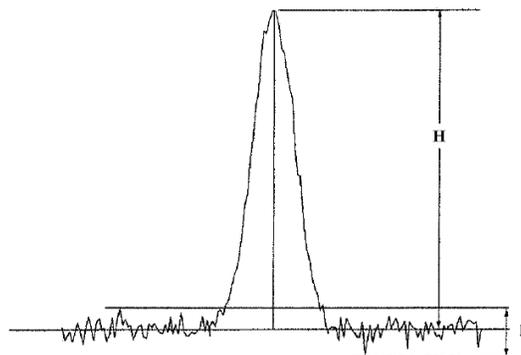


Figura 12 – Cromatograma exemplificando a relação sinal-ruído.

3.1.5 Precisão

A precisão de um método representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra em iguais condições de análise. Na validação de métodos a precisão é expressa através do coeficiente de variação e avaliada em diferentes níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade⁷³⁻⁷⁹.

A repetitividade ou repetibilidade, como é descrito pela ANVISA⁷⁴, corresponde aos resultados obtidos a partir de um mesmo método, em iguais condições e dentro de um pequeno intervalo de tempo, geralmente no mesmo dia. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%⁷⁴.

A precisão intermediária representa o efeito de algumas variações no próprio laboratório devido à realização das análises em diferentes dias, analistas e equipamentos. Normalmente para métodos que quantificam compostos em quantidades maiores é usada a especificação de $CV < 5,0\%$, entretanto, métodos estatísticos de hipótese devem ser usados para garantir que os resultados não apresentam diferença estatística significativa. Para tal finalidade podem ser usados os testes de significância por comparação das médias das duas precisões, teste t, ou a partir da comparação dos desvios padrão, teste F ⁹⁰.

Os testes de significância são usados para avaliar dados experimentais e no exemplo da avaliação da precisão intermediária, se a diferença entre dois resultados é significativa.

Para o teste de comparação de duas médias, têm-se duas médias amostrais X_1 e X_2 e, segundo o teste, adota-se a hipótese nula de que as duas médias apresentam o mesmo resultado, sendo necessário testar se a diferença entre as médias é significativamente diferente de zero ou não, no nível de confiança de 95,0%.

Se as precisões intradia e interdia apresentam estimativas de desvio padrão absoluto, Equação 14, que não são significativamente diferentes, uma estimativa associada do desvio padrão, Equação 15, pode ser calculada a partir das duas estimativas de desvios padrão s_1 e s_2 , conforme equações 14 e 15.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad \text{Equação 14}$$

$$s^2 = \frac{[(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2]}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad \text{Equação 15}$$

A partir da estimativa do desvio padrão pode-se determinar o valor do “t de Student”, Equação 16, onde t apresenta $n_1 + n_2$ graus de liberdade. O valor obtido em módulo é comparado com o valor de t tabelado. Se o valor de t observado for menor que o valor de t tabelado, a hipótese nula é aceita e, desta forma, pode-se concluir que as médias não diferem significativamente.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \quad \text{Equação 16}$$

Para testar no mesmo método analítico, o quanto a precisão intradia difere da precisão interdia, pode ser utilizado um teste bi-caudal, conhecido como teste $F^{90,94}$, no qual são comparadas as estimativas de desvios padrão. O teste F considera a relação de variâncias de duas amostras, isto é, a relação dos quadrados das estimativas do desvio padrão. A quantidade calculada (F) pode ser obtida conforme a Equação 17, na qual os parâmetros são colocados na equação de tal forma que F é sempre ≥ 1 . A hipótese nula adotada é que as populações de onde as amostras são tomadas são normais e que as variâncias das populações são iguais.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{Equação 17}$$

Se a hipótese nula for verdadeira, então a relação de variâncias deve ser muito próxima de 1. Valores diferentes da unidade, entre a razão das variâncias, ocorrem devido às variações aleatórias, mas se a diferença é elevada, ela não pode ser atribuída a esta

causa. Caso o valor calculado de F exceder um determinado valor crítico então a hipótese nula deve ser rejeitada. Este valor crítico de F depende do tamanho de ambas as amostras, do nível de significância e do tipo de teste executado.

A reprodutibilidade é avaliada pela concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro⁷⁴ de medicamentos na ANVISA e não serão avaliados nesta pesquisa.

3.1.6 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais, encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro^{74,78,79}.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, para que se possa considerar como a eficiência do método varia em função da concentração. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações⁷³.

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado ao placebo, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito. A ANVISA⁷⁴ adota como procedimento mais usual a pesagem do analito e placebo em diferentes concentrações e a verificação a partir de, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada. A exatidão, em termos de recuperação, é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, Equação 18. A faixa de recuperação sugerida para estudo da exatidão é de 98 % a 102 %, com DPR < 5%.

$$\text{Exatidão(recuperação)} = \frac{\text{Concentração (experimental)}}{\text{Concentração (teórica)}} \times 100 \quad \text{Equação 18}$$

Para métodos usados na avaliação do teor do fármaco como matéria-prima ou no produto acabado, a ANVISA⁷⁵ adota para recuperação a faixa próxima a concentração da solução final do ativo na amostra, geralmente de 80% a 120% desta concentração e de 70% a 130% para uniformidade do conteúdo. Para métodos para quantificação de impurezas o ensaio de exatidão segue a faixa de concentração avaliada na linearidade do método, ou seja, do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado.

No estudo da exatidão devem ser usados materiais de referência acompanhados de certificado que apresentem o valor da concentração da substância em questão. Para fins de registro de medicamentos junto à ANVISA, é recomendado o uso de padrão certificados obtidos da farmacopéia brasileira e de outros compêndios oficiais⁷⁴.

3.1.7 Estabilidade da solução

As soluções da amostra e do padrão devem apresentar estabilidade por um período mínimo da realização dos demais ensaios de validação e pelo tempo previsto na análise a que se propõe o método para que se tenham resultados confiáveis⁷⁴.

O tempo determinado na estabilidade e a condição de estocagem da solução em temperatura ambiente ou em refrigeração permitem que a análise seja realizada antes de ocorrer a degradação do composto. Como o tempo necessário para liberar um produto em controle de qualidade é cada vez menor, o tempo avaliado na estabilidade das soluções não deve ser muito extenso, além do fato que em algumas análises as soluções devem ser preparadas no mesmo dia de injeção no sistema cromatográfico.

O ensaio é realizado preparando soluções padrão e amostra de acordo com o método e injetando as soluções no tempo inicial da validação e em horários determinados. As áreas obtidas são avaliadas quanto ao DPR, sendo aceito o valor máximo de 2%.

3.1.8 Robustez

A robustez de um método analítico é uma medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos^{73,74}.

As seguintes alterações no método poderão ser realizadas na avaliação da robustez:

- variação na composição FM;
- diferentes lotes ou fabricantes de coluna;

- variação do pH da FM em $\pm 0,1$ unidades de pH;
- vazão da FM em $\pm 5\%$;
- temperatura da coluna em ± 5 °C.

Avaliação deve ser realizada injetando soluções padrão e amostra de acordo com o método desenvolvido e em cada condição alterada. Com os dados obtidos é realizada a quantificação da amostra na condição controle e em cada condição analítica. A partir de uma comparação dos resultados obtidos nas condições alteradas com a condição controle é aceita uma variação de 2% entre as condições. Após avaliada a robustez e, sendo constatada a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento⁷⁴.

Capítulo II

Objetivo

1. OBJETIVO:

Este trabalho visou a preparação, caracterização e avaliação do comportamento físico, químico e cromatográfico da FE C8 com grupo polar uréia, inserido na cadeia n-alquila e sua aplicação no desenvolvimento de métodos para análise de diversos fármacos, a maioria com característica básica e, em alguns casos, a validação do método analítico.

Para tal, as seguintes etapas foram realizadas:

- ✚ Síntese do agente sililante a partir de 3-aminopropildimetiletoxissilano e octil isocianato.
- ✚ Caracterização do agente sililante.
- ✚ Imobilização do agente sililante à sílica Kromasil de 5 µm.
- ✚ Reação de capeamento com trimetilclorossilano e hexametildissilazano.
- ✚ Caracterização física e química da FE antes e após o capeamento.
- ✚ Avaliação do desempenho cromatográfico das FE preparadas por diferentes misturas sintéticas.
- ✚ Avaliação da estabilidade das FE com FM tamponada.
- ✚ Aplicação das FE na separação de fármacos e comparação com as fases disponíveis comercialmente.
- ✚ Desenvolvimento e validação de métodos analíticos utilizando a FE preparada para determinação de fármacos em comprimidos, cápsulas, xaropes dentre outras formulações farmacêuticas.
- ✚ Estudo de degradação de fármacos em meio oxidativo, ácido, alcalino e temperatura.
- ✚ Aplicação dos métodos validados no estudo de estabilidade de medicamentos.

Capítulo III

Preparação, Caracterização e Avaliação Cromatográfica da FE Preparada.

1 Introdução

A preparação do novo agente sililante seguiu o procedimento experimental para preparação de novas FE para CLAE, contendo grupos polares do tipo uréia inseridos na cadeia N-alquila, para a separação e a purificação de compostos básicos⁹⁵. A preparação da fase foi realizada de acordo com os procedimentos de obtenção de segunda geração de FE com grupo polar embutido, a partir da incorporação do grupo uréia na cadeia alquila. A FE foi obtida a partir da síntese do agente sililante contendo o grupo uréia, seguida da modificação da superfície da sílica, com ligação química do agente sililante à superfície da sílica e posterior reação de capeamento.

2 Parte Experimental

2.1 Materiais

2.1.1 Equipamentos

- ✚ Agitador rotatorque, Cole-Parmer, modelo 7637-01.
- ✚ Agitador Vórtex, Phoenix, modelo AP56.
- ✚ Analisador elementar, Perkin-Elmer, modelo 2400.
- ✚ Balança Analítica, Fisher Scientific, modelo A-250 (0,0001 g).
- ✚ Bomba para enchimento de colunas, Haskel, modelo 51769.
- ✚ Centrífuga, Fischer Scientific, modelo 225.
- ✚ Cromatógrafo a líquido, Shimadzu, composto de uma bomba de alta pressão, Shimadzu modelo LC-10 AD; detector de absorção no UV-Vis de comprimento de onda variável, Shimadzu modelo SPD-10 AV; válvula de injeção (alça de amostragem 5 µL), Rheodyne modelo 8125; Softwares usados para aquisição de dados - ChromPerfect for Windows 3.52.
- ✚ Cromatógrafo a líquido, Merck-Hitachi Elite, composto de uma bomba de alta pressão de quatro canais L-7130, forno Merck-Hitachi L-2300, injetor automático Merck-Hitachi L-2200, detector por arranjo de diodo Merck-Hitachi L-2450 e software EZChrom .
- ✚ Espectrômetro de absorção na região do infravermelho, Perkin-Elmer, modelo FTIR 1600.
- ✚ Estufa a vácuo, Yamato, modelo ADP-21.
- ✚ Forno tubular, EDG, modelo 10P-S.

- ✚ pH-metro Metrohm 744 pH meter.
- ✚ Sistema de deionização de água, Milli-Q plus, Millipore.
- ✚ Ultrassom, Thornton, modelo T14.
- ✚ Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Varian, modelo INOVA 500.
- ✚ Espectrômetro de massas AutoSpec, Micromass.

2.1.2 Reagentes

- Acenafteno p.a., Aldrich.
- Acetofenona p.a., Sigma.
- Acetonitrila grau HPLC, J.T.Baker.
- 3-aminopropildimetiletoxissilano p.a, Sigma Aldrich.
- Anilina p.a., Fluka.
- Benzeno p.a., Synth.
- Benzilamina p.a., Merck.
- Benzonitrila p.a., Riedel – de Häen.
- Butilbenzeno p.a., Merck.
- Cafeína p.a., Sigma.
- Cloridrato de Amitriptilina p.a, doado pela Medley.
- Clorofórmio p.a., Tedia.
- Etilbenzeno p.a., Sigma
- Fenol p.a., Aldrich.
- Ftalato de dibutila p.a., Sigma
- Fosfato de potássio dibásico p.a., Merck
- Hexametildissilazano p.a., Sigma Aldrich.
- Isopropanol p.a., Tedia.
- Metanol grau HPLC, J.T.Baker.
- Naftaleno p.a., Carlo Erba.
- N,N-dimetilanilina p.a., Fluka.
- Octil isocianato p.a., Sigma Aldrich.
- *o*-terfenila p.a., Merck.
- Pentilbenzeno p.a., Merck.
- Piridina p.a., Merck.

- Sílica Kromasil, partículas de 5 µm, Akzo Nobel.
- Tetraidrofurano grau HPLC, Tedia.
- Tolueno p.a., Merck.
- Trifenileno p.a., Fluka.
- Trietilamina p.a., Merck.
- Trimetilclorossilano p.a., Sigma Aldrich.
- Uracila p.a., Sigma Aldrich.

2.1.3 FE e colunas comerciais

- LiChrosphere[®] 60 Select B, Merck, FE constituída por partículas esféricas, diâmetro médio de 5 µm e dimensão de coluna de 60 x 3,9 mm de d.i.
- LiChrosphere[®] 100 RP8, Merck, FE constituída por partículas esféricas, diâmetro médio de 5 µm e dimensão de coluna de 125 x 4,0 mm de d.i., (C8ne).
- LiChrosphere[®] 100 RP8e, Merck, FE constituída por partículas esféricas, diâmetro médio de 5 µm, capeada e dimensão de coluna de 125 x 4,0 mm de d.i., (C8e).
- Kromasil[®] C8, Eka Chemicals, FE constituída por partículas esféricas, diâmetro médio de 5 µm, capeada e dimensão de coluna de 150 x 3,9 mm de d.i.

A Tabela 4 apresenta os dados de porcentuais de carbono, área superficial e espessura da camada das FE comerciais LiChrosphere e Kromasil.

Tabela 4: Porcentuais de C, área superficial e espessura da camada das FE comerciais.

Fase estacionária	C (%)	S _{BET} (m ² /g)	τ (µmol m ⁻²)
LiChrosphere [®] 60 Select B	11,5	360	3,55
LiChrosphere [®] 100 RP8	12,5	350	4,04
LiChrosphere [®] 100 RP8e	13,0	350	4,44
Kromasil [®] C8	12,0	340	3,60

A Figura 13 apresenta as estruturas químicas das FE LiChrosphere[®] 100 RP8 e LiChrosphere[®] 100 RP8e. A estrutura química da FE Kromasil C8 é semelhante a LiChrosphere[®] 100 RP8e pois é preparada a partir de um silano monofuncional seguida do processo de capeamento.

3.2 Imobilização química do agente sililante à sílica

A sílica cromatográfica empregada no processo de modificação com o agente sililante monofuncional C8 uréia foi a Kromasil®, com tamanho de partícula de 5 µm, 10 nm de tamanho de poro, da Akzo Nobel. Inicialmente a sílica foi lavada com água deionizada e seca sob vácuo à temperatura de 100 °C, por 10 horas. Uma amostra de cerca de 10,0 g de sílica foi suspensa em 150 mL de tolueno contendo 0,055 mol do agente sililante e trietilamina. A suspensão foi agitada mecanicamente e mantida sob refluxo em atmosfera inerte por 72 horas. A sílica modificada foi lavada com tolueno, metanol e água para promover a hidrólise dos grupos etóxi, que porventura ficaram remanescentes na superfície da sílica. Após esse procedimento, a sílica foi seca sob vácuo, a 60 °C, por 12 horas. A Figura 15 apresenta a reação química de imobilização química do agente sililante, [(octiluréia)propil]dimetiletossilano, à sílica.

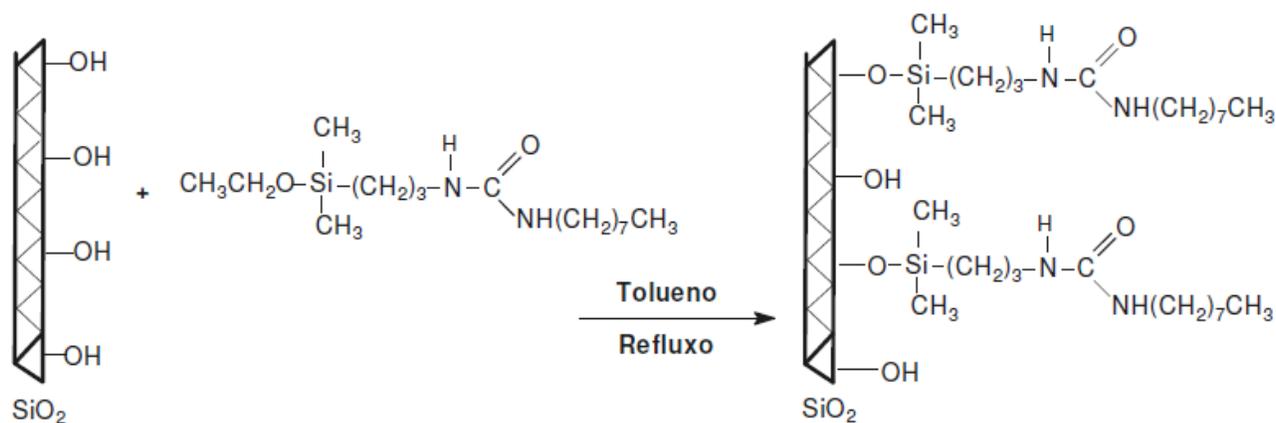


Figura 15 – Reação de imobilização química do agente sililante à sílica.

3.3 Reação de capeamento

A reação de bloqueio dos grupos silanóis remanescentes na superfície da sílica foi realizada reagindo a FE com uma mistura equimolar de trimetilclorossilano (TMCS) e hexametildissilazano (HMDS) em tolueno. A reação foi realizada refluxando cerca de 10,0 g de FE com excesso de TMCS (32,0 mL, 0,30 mol), HMDS (35,0 mL, 0,15 mol), 100,0 mL de tolueno e 4,0 mL de piridina. Após a mistura ter sido agitada a 100 °C, por 48 horas, o material foi filtrado e lavado com tolueno, metanol e água. A FE resultante, Si-C8-uréia, foi seca sob vácuo à temperatura ambiente e empregada no enchimento das colunas e nas

caracterizações cromatográfica, física e química. A Figura 16 apresenta a reação química de capeamento com HMDS e TMCS.

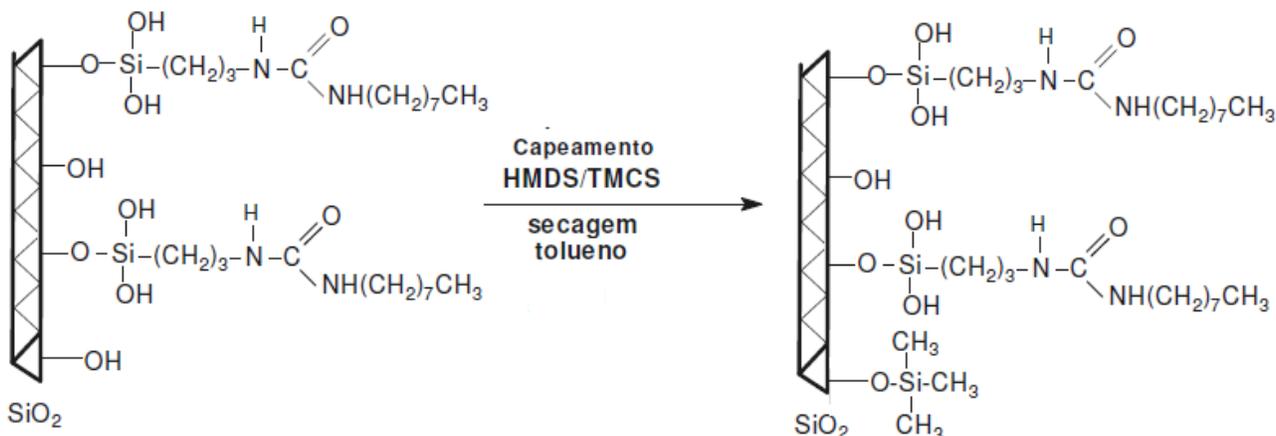


Figura 16 – Reação de bloqueio dos grupos silanóis com TMCS e HMDS.

3.4 Preparo das colunas cromatográficas

Após a extração, preparou-se uma suspensão da FE em um solvente apropriado, solvente de suspensão, para subsequente recheio da coluna cromatográfica. A função principal do solvente de suspensão é evitar uma sedimentação rápida e/ou aglomeração das partículas, pois, nestas condições, a FE tem o desempenho cromatográfico afetado negativamente. No preparo da suspensão, foram testados os solventes clorofórmio e uma mistura de tetraidrofurano e isopropanol na proporção de 9:1 v/v. Para o preparo da suspensão pesaram-se 0,70 g da FE em um tubo com tampa e adicionaram-se 7,0 mL do solvente de suspensão previamente filtrado, obtendo uma concentração da FE na suspensão de 10 % (m/v). Esta quantidade foi necessária para o enchimento de uma coluna cromatográfica de dimensão de 60 mm × 3,9 mm de d.i.. Em seguida, o tubo contendo a suspensão foi colocado em um agitador roto-torque e agitado mecanicamente por um período mínimo de 12 h, antes do enchimento da coluna cromatográfica. Para comparação com colunas comerciais descritas nos métodos farmacopéicos, foram recheadas colunas nas dimensões de 125 mm x 3,9 mm de d.i. e 150 mm x 3,9 mm de d.i. e para avaliação da FE usaram-se coluna de 60 mm x 3,9 mm de d.i.. Para a coluna de 125 mm foram utilizadas 1,4 g de FE e 14,0 mL do solvente de suspensão e para coluna de 150 mm foram usados 1,8 g de FE e 18,0 mL do solvente de suspensão. A

concentração da FE na suspensão para comparação das colunas foi também de 10% m/v. As colunas foram recheadas utilizando o método de suspensão a alta pressão, a 5000 psi. Uma coluna na dimensão de 60 x 3,9 mm foi recheada com uma FE Select-B Merck, com tamanho de partícula de 5 µm, para comparar a separação obtida com essa coluna e uma coluna recheada nas mesmas dimensões com a FE Si-C8-uréia preparada.

4 Caracterizações Química e Física

4.1 Análise elementar

O agente sililante e a FE obtida após a ligação química do agente sililante à sílica e após o capeamento foram submetidos à análise elementar para a determinação da porcentagem de carbono, com o objetivo de avaliar o grau de recobrimento efetivo do suporte cromatográfico. As porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram determinadas no analisador elementar 2400 da Perkin Elmer. O método empregado utiliza a combustão do material devidamente seco, pesado e transferido a uma cápsula de estanho inerte, seguida de oxidação em atmosfera de hélio/hidrogênio para converter os elementos da amostra em gases simples, como CO₂, H₂O e N₂^{14,44,96}. Os gases são homogeneizados e mantidos em condições controladas de pressão, temperatura e volume e, em seguida, são despressurizados, separados através de uma coluna cromatográfica e passam por um detector de condutividade térmica para quantificação por retenção seletiva. Os resultados são expressos em porcentagens de C, H e N.

O teste não foi avaliado quanto à presença de impurezas, pois a finalidade foi comprovar, juntamente com as demais técnicas de caracterização, o sucesso da preparação do agente sililante e a imobilização deste à sílica.

4.2 Área superficial e grau de recobrimento

A área superficial específica foi obtida pelas isotermas de adsorção na faixa de pressão relativa de 0,06 a 0,25, empregando o método de Brunauer, Emmett e Teller (BET)^{14,96-98}. As amostras foram secas a 100 °C por 24 h, sob vácuo de aproximadamente 15 mPa (10⁻⁴ torr). A porcentagem de carbono foi utilizada no cálculo da espessura da camada (τ), que indica o grau de recobrimento da superfície, como mostrado na Equação 18:

$$\tau = \frac{P_c}{1200n_c - P_c(MM - n_x)S_{BET}} \quad \text{Equação 18}$$

onde **P_c** é a porcentagem de carbono na sílica modificada, **n_c** o número de átomos de carbono da molécula orgânica imobilizada, **MM** a massa molar do silano imobilizado, **n_x** o número de grupos reativos do alcoxissilano de partida, sendo para o monofuncional 1 e **S_{BET}** é a área superficial da sílica original calculada a partir da isoterma de nitrogênio.

4.3 Espectroscopia de absorção na região do IV

A avaliação qualitativa da presença de grupos funcionais característicos do etoxissilano foi realizada por espectroscopia de absorção no infravermelho. Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos sob a forma de pastilhas de brometo de potássio, no intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹, empregando uma resolução de 4 cm⁻¹ e uma taxa de 32 varreduras por minuto, utilizando um espectrômetro de absorção no infravermelho Perkin-Elmer modelo FTIR 1600.

4.4 Espectroscopia por RMN de ¹H e de ¹³C

A ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹³C e ¹H foi realizada no espectrômetro INOVA da Varian. As amostras do agente sililante foram dissolvidas em tetracloreto de carbono, CCl₄. As frequências utilizadas foram de 400 e 125 MHz para os núcleos de ¹³C e ¹H respectivamente. Um capilar contendo água deuterada (HDO) foi utilizado como referência para os espectros de RMN de ¹H e o próprio solvente, CCl₄, para os espectros de ¹³C.

4.5 Espectroscopia por RMN de ²⁹Si

Os espectros de RMN no estado sólido de ²⁹Si para a FE antes e após a reação de capeamento, foram obtidos no espectrômetro INOVA, da Varian, utilizando a técnica de polarização cruzada e rotação do ângulo mágico (CP/MAS), tempo de contato de 5 ms, intervalo de pulso de 2 s e frequência de 75,5 MHz.

4.6 Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro AutoSpec, Micromass, utilizando o modo de ionização de impacto de elétrons, com uma energia de ionização de 75 eV e temperatura da sonda acima da temperatura de fusão das amostras. O sistema usado não estava acoplado a um cromatógrafo, desta forma, foi realizada a injeção direta da amostra por infusão.

5 Avaliação cromatográfica

5.1 Caracterização cromatográfica da FE através de misturas testes

As colunas recheadas com a FE Si-C8-uréia foram avaliadas com relação à seletividade, hidrofobicidade, atividade silanofílica e troca-iônica, através de mistura teste I, contendo compostos apolares, polares, de Tanaka *et al.*⁵³, Engelhardt e Jungheim⁵² e de Neue *et al.*⁵⁴.

5.1.1 Mistura teste I

A etapa inicial da avaliação cromatográfica da FE Si-C8-uréia consistiu na determinação da vazão ótima da FM, por meio da curva de van Deemter, e da composição ideal utilizando a mistura teste I contendo os compostos: uracila (1 mg L⁻¹), benzonitrila (30 mg L⁻¹), benzeno (30 mg L⁻¹), tolueno (30 mg L⁻¹) e naftaleno (30 mg L⁻¹). As composições das FM avaliadas foram 60:40 e 50:50 (v/v), de acetonitrila:água. Para comparação da eficiência, foi realizada a separação em uma coluna de dimensões de 150 x 3,9 mm contendo a FE C8-Kromasil comercial.

5.1.2 Mistura II

A mistura-teste II foi utilizada para avaliação da interação dos analitos, principalmente básico, com a FE sobretudo os grupos silanóis residuais, sendo constituída por: uracila (1 mg L⁻¹), fenol (ácido, 20 mg L⁻¹), N,N-dimetilanilina (básico, 20 mg L⁻¹), naftaleno (apolar, 30 mg L⁻¹) e acenafteno (apolar, 50 mg L⁻¹).

A mistura foi preparada qualitativamente em FM acetonitrila:água 50:50 (v/v) e armazenada em geladeira. A uracila foi adicionada à mistura para a obtenção do t_M , essencial para o cálculo dos parâmetros cromatográficos.

5.1.3 Mistura teste de Neue

A mistura teste de Neue *et al.*⁵⁴ foi utilizada para avaliar as propriedades hidrofóbicas, silanofílicas e de troca-iônica da nova FE preparada. A mistura teste contém compostos neutros e básicos diluídos na FM: uracila ($16 \mu\text{g mL}^{-1}$), naftaleno ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$), acenafteno ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$), propranolol ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) e amitriptilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). A FM usada no teste consistiu de uma mistura de metanol e solução tampão pH 7,0 de fosfato de potássio dibásico 65:35, v/v; temperatura de 25 °C e detecção UV a 254 nm.

A separação foi realizada na coluna Si-C8-uréia e comparada às separações obtidas com colunas LiChrosphere[®] 60 Select B, LiChrosphere[®] 100 RP8 e LiChrosphere[®] 100 RP8e.

5.1.4 Mistura teste de Engelhardt e Jungheim

A FE Si-C8-uréia foi analisada pela mistura teste de Engelhardt e Jungheim⁵² quanto à atividade silanofílica (atividade dos grupos silanóis residuais) e a seletividade hidrofóbica (ou hidrofobicidade). A mistura foi preparada a partir dos compostos: uracila (1 mg L^{-1}), anilina (15 mg L^{-1}), fenol (20 mg L^{-1}), N,N-dimetilanilina (20 mg L^{-1}), tolueno (30 mg L^{-1}) e etilbenzeno (30 mg L^{-1}). A FM usada no teste consistiu de uma mistura de metanol:água 55:45 (v/v), temperatura de 40 °C e detecção UV a 254 nm.

5.1.5 Mistura teste de Tanaka

As principais propriedades avaliadas pela mistura teste de Tanaka *et al.*⁵³ incluem: o recobrimento superficial, a seletividade hidrofóbica, a seletividade espacial ou estérica, a capacidade de ligação de hidrogênio e a capacidade de troca iônica em pH 2,7 e 7,6. A mistura I de Tanaka contém os compostos uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, *o*-terfenila e trifenileno. A mistura II do protocolo de Tanaka foi preparada a partir dos compostos uracila, cafeína e fenol. As misturas III e IV do protocolo de Tanaka, constituídas pelos compostos uracila, benzilamina e fenol, foram analisadas em diferentes pH de FM 2,7 e 7,6, respectivamente.

5.2 Avaliação da estabilidade química da FE

A estabilidade química da FE Si-C8-uréia, foi avaliada em condição de FM tamponada, utilizando a mistura teste de Neue⁵⁴. A FM usada no teste consistiu de uma mistura de metanol e solução tampão pH 7,0 de fosfato de potássio dibásico 65:35, v/v; temperatura de 25 °C e detecção UV a 254 nm. A estabilidade química em condições tamponadas foi avaliada pelo monitoramento de parâmetros cromatográficos, como eficiência, fator de assimetria calculado a 10 % da altura do pico e fator de retenção para o composto mais retido (amitriptilina) da mistura teste de Neue⁵⁴. A FM foi eluída através das colunas cromatográficas, contendo as FE, a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹, empregando uma temperatura de 35 °C. As colunas foram periodicamente avaliadas quanto ao comportamento cromatográfico da mistura teste de Neue⁵⁴ e a estabilidade de cada FE foi determinada em função do número de volume de colunas de FM eluída através de cada coluna cromatográfica. O volume de coluna corresponde ao volume de FM que ocupa os espaços dentro da coluna, os quais não são preenchidos pelo recheio cromatográfico – volume de coluna cheia (V_{col}). O volume de coluna foi calculado a partir do t_M (uracila) e da vazão da FM (F), conforme a Equação 20:

$$V_{col} = F \times t_M \quad \text{Equação 20}$$

O valor de V_{col} calculado foi igual a 0,58 mL de FM. As condições empregadas neste teste aceleram a deterioração da coluna, possibilitando avaliações mais rápidas com a utilização de uma quantidade menor de FM e em tempo reduzido.

6 Resultados e discussão

6.1 Preparação do agente sililante e da FE

A preparação do agente sililante C8 uréia seguiu o procedimento experimental já patenteado⁹⁵ realizada a partir de uma reação dos precursores 3-aminopropildimetiletoxissilano e octil isocianato, em condições descritas na parte experimental e a reação apresentada na Figura 14.

A estrutura química do agente sililante formado, [(octiluréia)propil]dimetiletoxissilano, contendo o grupo polar derivado da uréia, -NH-C(O)-NH-, e da FE Si-C8-uréia foram apresentadas nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

6.2 Caracterização química e física

6.2.1 Análise Elementar

6.2.1.1 Agente sililante

Na análise elementar, foram determinadas as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio no silano sintetizado. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 5 e estão de acordo com as porcentagens calculadas e com a estrutura proposta do silano.

Tabela 5: Porcentuais de C, H e N obtidos experimentalmente (exp) e calculados (calc) para o alcoxissilano.

Silano	Fórmula molecular	% C _{calc}	% C _{exp}	% H _{calc}	% H _{exp}	% N _{calc}	% N _{exp}
C8 uréia	C ₁₆ H ₃₆ N ₂ O ₂ Si	60,8	60,1	11,4	11,4	8,9	9,0

6.2.1.2 Análise elementar e espessura da camada da FE

As porcentagens de carbono, hidrogênio, nitrogênio e a espessura da camada da FE Si-C8-uréia antes e após o processo de capeamento são apresentadas na Tabela 6. O valor da área superficial (S_{BET}) da FE utilizado no cálculo da espessura da camada de FE foi de 325,4 m² g⁻¹, e o valor obtido após o capeamento foi de 229,3 m² g⁻¹, sendo apropriado para as finalidades cromatográficas⁹⁹, mostrando que a ligação do agente sililante à sílica não altera, de forma significativa, as propriedades apropriadas da sílica.

Tabela 6 – Porcentuais de C, H, e N obtidos na análise elementar para a FE Si-C8-uréia antes e após o capeamento e a espessura da camada de FE.

FE Si-C8-uréia	C %	H %	N %	τ ($\mu\text{mol m}^{-2}$)
antes do capeamento	12,4	2,48	2,12	3,0
após o capeamento	13,1	2,83	2,03	3,2

Como pode ser observado na Tabela 6, após o processo de capeamento, a sílica modificada apresentou um aumento no percentual de carbono. Os valores obtidos para a

espessura da camada foram próximos aos de Silva^{10,23} na avaliação de outras FE com grupo polar uréia inserido na cadeia alquila C18: 3,0 a 4,0 $\mu\text{mol m}^{-2}$. Silva *et al.*¹¹ apresentaram um valor de recobrimento de 1,62 $\mu\text{mol m}^{-2}$ para a FE C18 contendo grupo polar carbamato. Matyska *et al.*⁹⁶ obtiveram recobrimento de 0,69 a 2,97 $\mu\text{mol m}^{-2}$ para FE contendo grupo polar amino. Horak e Lindner⁹⁷ obtiveram uma espessura de camada para FE capeada C3-S-C18 de 1,56 $\mu\text{mol m}^{-2}$. Engelhardt e Orth⁹⁸ avaliaram a FE obtida pelo recobrimento com alcoxiocetilssilano e obtiveram valores de 1,07 a 4,25 $\mu\text{mol m}^{-2}$. Euerby e Petersson³³ realizaram a classificação cromatográfica e a comparação entre colunas comerciais contendo grupo polar, obtendo os seguintes resultados para os recobrimentos: XTerra RP8 (carbamato) 2,41 $\mu\text{mol m}^{-2}$, Symmetry Shield RP8 (carbamato) 3,29 $\mu\text{mol m}^{-2}$, Prism RP (C12-uréia) 3,1 $\mu\text{mol m}^{-2}$, Symmetry Shield RP18 (carbamato) 3,21 $\mu\text{mol m}^{-2}$ e Discovery RP amida C16 (amida) 2,6 $\mu\text{mol m}^{-2}$. De acordo com esses resultados e os dados de espessura de camada apresentados na Tabela 4 para as FE LiChrosphere[®] 60 Select B, LiChrosphere[®] 100 RP8, RP8e e Kromasil[®] C8 a FE obtida Si-C8-uréia apresentou um grau de recobrimento semelhante e até maior que outras FE comerciais indicando compatibilidade com estas FE, como também apresentando separações tão eficientes quanto as esperadas com as FE comerciais. Em separações analíticas utilizando FE quimicamente ligadas a espessura da camada geralmente abrange a faixa de 2,0 a 4,0 $\mu\text{mol m}^{-2}$, indicando uma redução da concentração dos silanóis residuais presentes na superfície da sílica.

6.2.2 Análise na região do IV

6.2.2.1 Análise na região do IV do agente sililante

No espectro de absorção no infravermelho do silano sintetizado, apresentado na Figura 17, foram observadas as bandas representativas dos grupos funcionais característicos do silano, [(octiluréia)propil]dimetiletoxissilano.

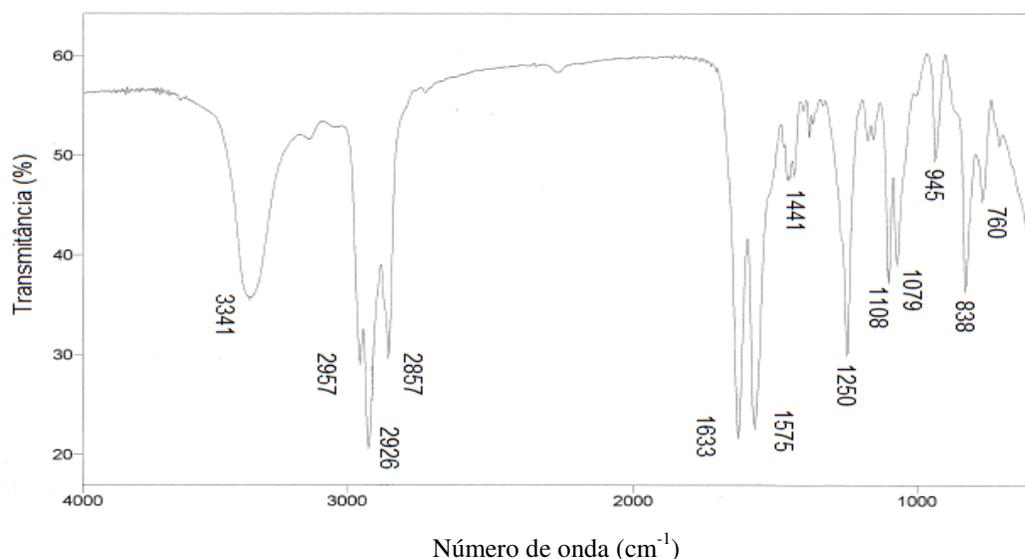


Figura 17 - Espectro de absorção na região do IV para o agente sililante.

As principais bandas observadas são: 3341 cm^{-1} , correspondente ao estiramento das ligações N-H, na região entre 2970 à 2850 cm^{-1} , referentes ao estiramento da ligação C-H nos grupos CH_2 e CH_3 e em 1633 cm^{-1} uma banda atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ ^{10,23}, detectada em uma frequência menor que a esperada para aldeídos e cetonas, devido aos dois átomos de nitrogênio próximos à carbonila. Outras bandas significativas podem ser observadas em 1575 cm^{-1} , devido à deformação angular da ligação N-H e uma banda de pequena intensidade em 3160 cm^{-1} , referente ao primeiro harmônico da banda em 1575 cm^{-1} . Outras duas bandas observadas em 1108 e 1079 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento da ligação Si-O. A banda na região de 970 cm^{-1} é característica dos grupos silanóis livres. As bandas descritas acima características dos grupos funcionais do agente sililante e as bandas em 3340 , 1633 e 1575 cm^{-1} indicam que o alcoxissilano foi obtido com sucesso.

6.2.2.2 Análise da FE na região do IV

A FE Si-C8-uréia foi caracterizada inicialmente por espectroscopia de absorção no infravermelho para verificar a presença de grupos funcionais característicos. A Figura 18A apresenta o espectro do suporte de sílica e a Figura 18B da FE modificada com o silano monofuncional antes e após o processo de capeamento.

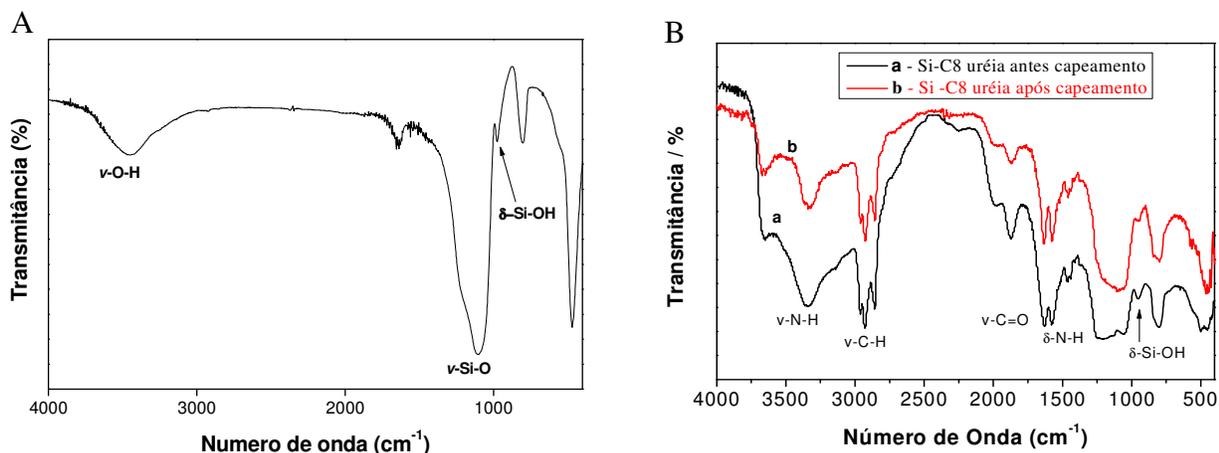


Figura 18 – Espectros de absorção na região do IV: A) suporte da sílica; B) FE Si-C8-uréia; a) FE Si-C8-uréia antes do capeamento e b) FE Si-C8-uréia após o capeamento.

Nos espectros da FE, Figura 18B, foram observadas novas bandas na região de 3341, 2960 a 2850, em 1633 e em 1575 cm^{-1} , que são devidas à imobilização do agente sililante na superfície da sílica. As principais bandas observadas para o agente sililante, Figura 17, podem ser também visualizadas no espectro da FE Si-C8-uréia, ou seja, a banda em 1630 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação C=O e as três bandas na região de 3000 cm^{-1} são as principais evidências da presença do grupo polar uréia embutido na cadeia alquila^{10,11,25}. Como pode ser observado na Figura 18B, não houve alteração significativa na estrutura química da molécula orgânica imobilizada após o capeamento, apresentando as mesmas bandas de absorção características da FE não capeada, com redução da banda dos silanóis residuais. Os resultados apresentados nos espectros de absorção da FE indicam que a imobilização do agente sililante à sílica foi realizada com sucesso.

6.2.3 Análise de RMN de ^1H para o agente sililante

No espectro de RMN de ^1H do alcoxissilano sintetizado, [(octiluréia)propil]dimetiletoxissilano, apresentado na Figura 19, foram observados alguns sinais característicos do agente sililante.

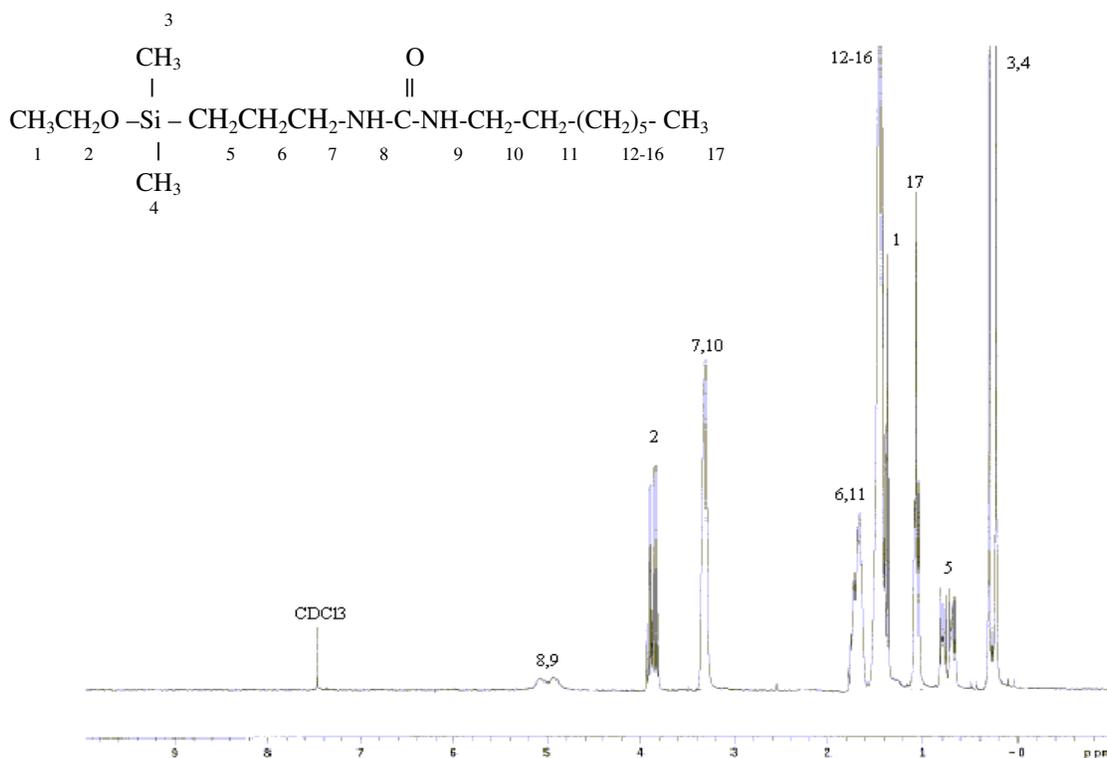


Figura 19 - Espectro de RMN de ¹H para o silano sintetizado.

Os dois sinais na região de $\delta = 5,0$ ppm são atribuídos aos hidrogênios 8 e 9 ligados aos átomos de nitrogênio do grupo uréia^{23,53}. Em $\delta = 0,2$ ppm foi observado um sinal referente aos hidrogênios 3 e 4 do grupo metila ligado diretamente ao átomo de silício. Os picos em $\delta = 1,2$ e $3,9$ ppm são atribuídos aos hidrogênios 1 e 2 do grupo etóxi do alcóxissilano sintetizado. Os hidrogênios 7 e 10 foram observados em $\delta = 3,2$ ppm e os hidrogênios 6 e 11 foram observados em $\delta = 1,6$ ppm. Em $\delta = 0,6$ ppm foi observado um sinal atribuído aos hidrogênios ligados ao carbono da ligação $\equiv\text{Si}-\text{C}$, carbono 5. Os hidrogênios 12-16 foram observados em um sinal de intensidade forte em $\delta = 1,4$ ppm. O sinal referente aos hidrogênios 17 do grupo metila terminal foi observado em $\delta = 1,1$ ppm. As atribuições dos sinais foram feitas em estudo realizado por Silva²³ na avaliação dos agentes siliantes [(3-dodeciluréia)propil]trietoxissilano e demais etossilanos.

6.2.4 Análise de RMN de ^{13}C

6.2.4.1 Agente sililante

A espectroscopia de RMN de ^{13}C no estado sólido é uma técnica que permite identificar as espécies químicas que foram ligadas na etapa de modificação química da superfície da sílica.

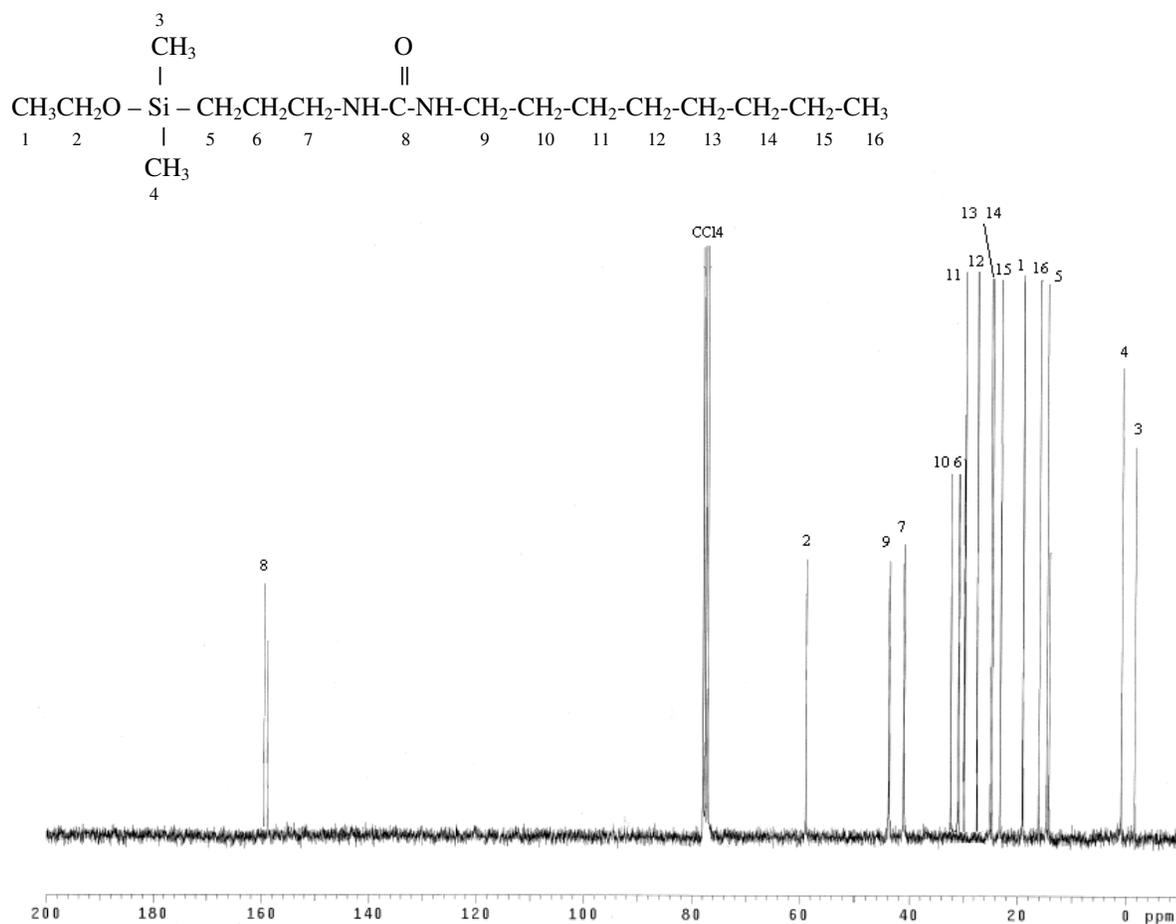


Figura 20 - Espectros de RMN de ^{13}C para o silano sintetizado.

No espectro de RMN de ^{13}C do agente sililante sintetizado, mostrado na Figura 20, foram observados alguns sinais que são característicos do alcóxissilano.

O sinal em $\delta = 78$ ppm é devido à presença do CCl_4 usado como solvente. O sinal em $\delta = 160$ ppm foi atribuído ao carbono do grupo carbonila da ligação da uréia, numerado de acordo com a estrutura fornecida no espectro do agente sililante^{10,11,23,25-27,42,100}. Os sinais em $\delta = 19$ e 58 ppm foram devidos aos carbonos 1 e 2, pertencentes ao grupo etóxi do

agente sililante^{10,23,25}. Os grupos metilas 3 e 4, ligados diretamente ao átomo de silício, foram observados na região de $\delta = 0$ ppm^{10,23,100}. Albert⁴² avaliou a FE ODS e também atribuiu o sinal em $\delta = 0$ ppm aos grupos metilas ligadas diretamente ao silício. Os outros sinais são característicos da cadeia alifática do alcoxissilano sintetizado. Os sinais apresentados mostram que o agente sililante foi obtido com sucesso a partir da reação do 3-aminopropildimetiletoxissilano e octil isocianato, permanecendo os sinais característicos.

6.2.4.2 FE Si-C8-uréia

As Figuras 21A e 21B mostram os espectros de RMN de ¹³C da FE Si-C8-uréia antes e após a reação de capeamento, respectivamente. Não foi observada nenhuma alteração na estrutura química do ligante orgânico após a etapa de modificação química. Não foram observados os sinais referentes ao grupo etóxi do agente sililante em 18 e 58 ppm, como era esperado, devido ao uso de um agente sililante monofuncional^{10,23}. Isto representa uma vantagem sobre o uso de etoxissilano trifuncional, que, após a imobilização, pode deixar grupos etóxi sem reagir com os silanóis da sílica, necessitando de um processo mais cuidadoso na lavagem para hidrolisar os grupos remanescentes antes da reação de capeamento com o agente sililante mais reativo.

As atribuições dos picos foram baseadas no espectro de RMN de ¹³C do agente sililante em CCl₄. Alguns sinais que são característicos do alcoxissilano foram observados para a FE Si-C8-uréia. O sinal em $\delta = 160$ ppm foi atribuído ao carbono do grupo carbonila da ligação da uréia. Os grupos metilas 1 e 2, ligados diretamente ao átomo de silício, foram observados na região de $\delta = 0$ ppm^{10,23,100}.

Os sinais identificados nos espectros de RMN de ¹³C mostraram que a imobilização do agente sililante à sílica foi realizada com sucesso a partir da confirmação dos sinais característicos do silano.

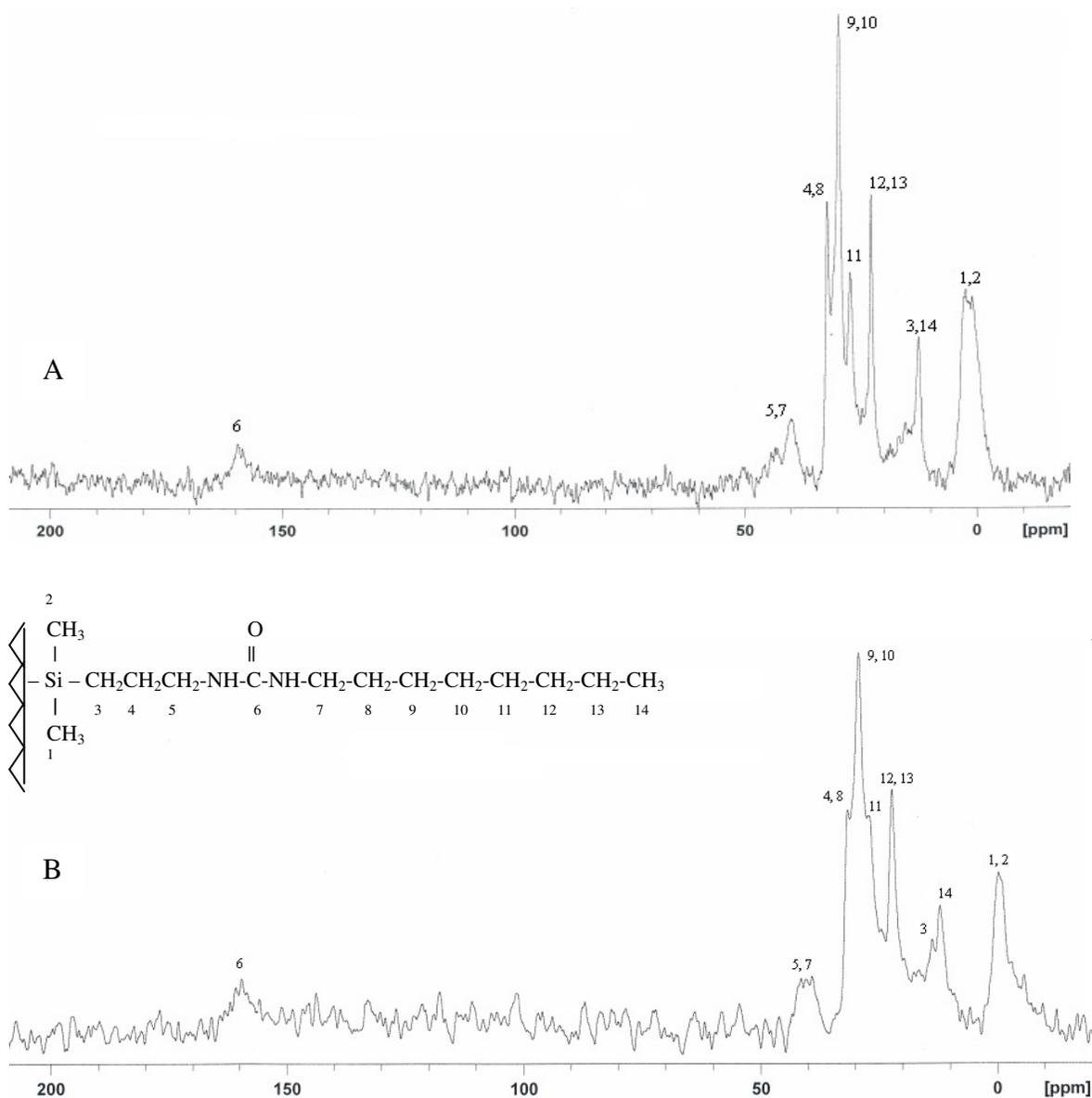


Figura 21 - Espectros de RMN de ^{13}C para a FE Si-C8-uréia (A) antes e (B) após o capeamento.

6.2.5 Análise de RMN de ^{29}Si

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{29}Si é uma técnica de análise muito útil na determinação das espécies de silício na matriz da sílica para avaliação das modificações químicas ocorridas. A Figura 22 apresenta os espectros de RMN de ^{29}Si da sílica pura e da FE antes e após a reação de capeamento.

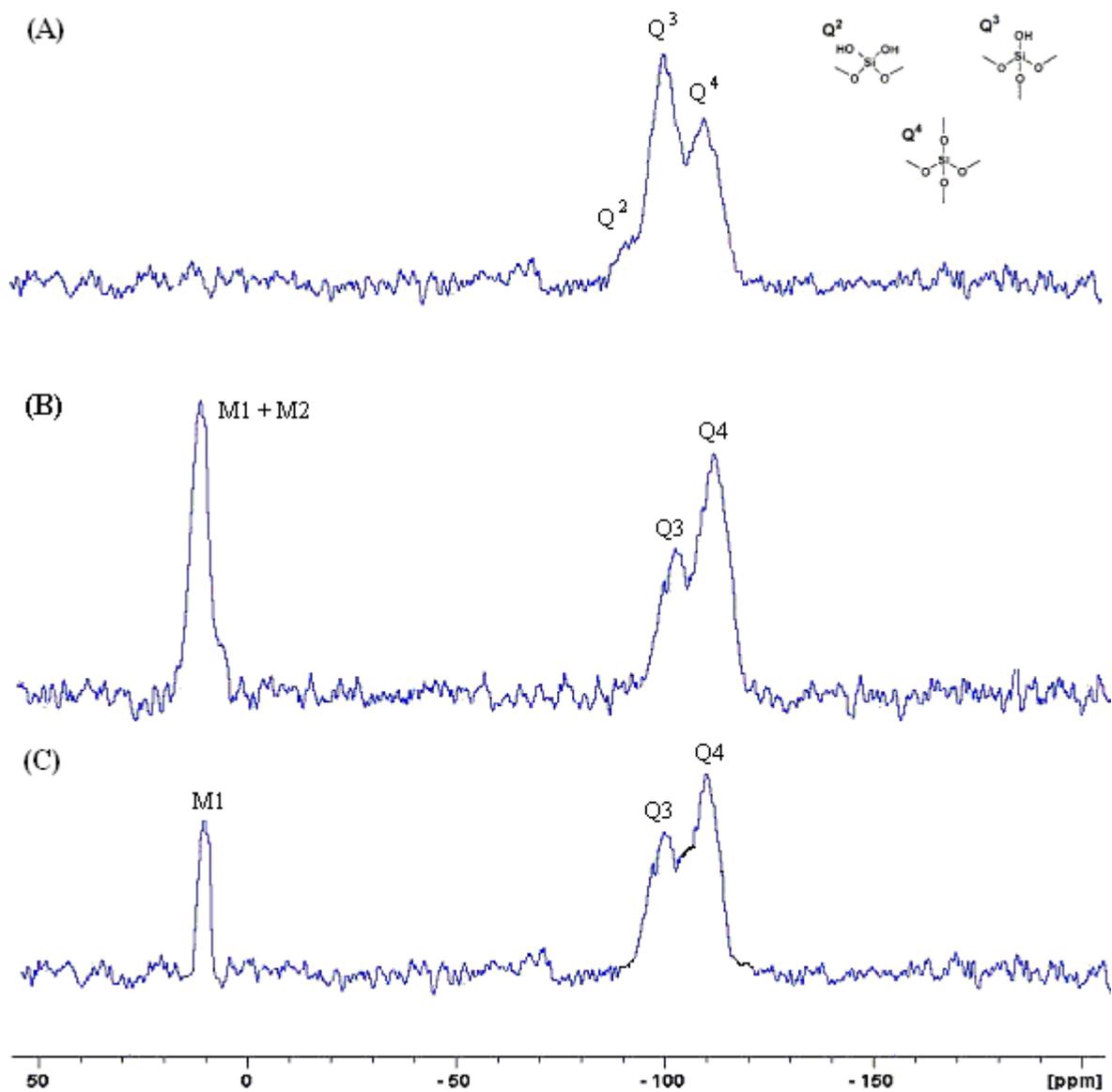


Figura 22 - Espectros de CP/MAS de RMN de ^{29}Si para a sílica pura (A), FE Si-C8-uréia após o capeamento (B) e antes do capeamento (C).

No espectro da sílica pura (Kromasil) foram detectados grupos pertencentes à estrutura inorgânica da sílica: silanóis germinais (Q^2) em -92 ppm, silanóis livres e vicinais (Q^3) em -101 ppm e siloxanos em -110 ppm^{10,23,42}. Na modificação da sílica foi empregado o agente sililante monofuncional e, espera-se, apenas uma única espécie de silício, além das espécies Q^n do suporte da sílica.

No espectro da FE Si-C8-uréia foi observado um decréscimo na população dos grupos silanóis Q^2 e Q^3 após a reação com o agente sililante, indicando que houve a imobilização do agente na superfície da sílica. Também foi observado um novo sinal em +

12 ppm, referente ao M1, correspondente ao silano monofuncional imobilizado na superfície da sílica^{10,42}. Após a reação de capeamento, espera-se que os grupos silanóis residuais sejam substituídos pelos grupos $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ formando novas espécies do tipo M2. Estas espécies, introduzidas na segunda modificação química, não podem ser diferenciadas das espécies M1 por apresentarem o mesmo deslocamento químico em +12 ppm. No espectro da FE Si-C8-uréia após o capeamento foi observado um aumento na intensidade do pico das espécies M em +12 ppm, devido às espécies M1 e M2, redução da intensidade do pico referente à espécie Q³ e aumento da espécie Q⁴.

6.2.6 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas também foi utilizada para caracterizar o agente sililante sintetizado e comprovar a massa molar proposta para esse composto. A Figura 23 mostra o espectro de massas obtido para o alcoxissilano sintetizado.

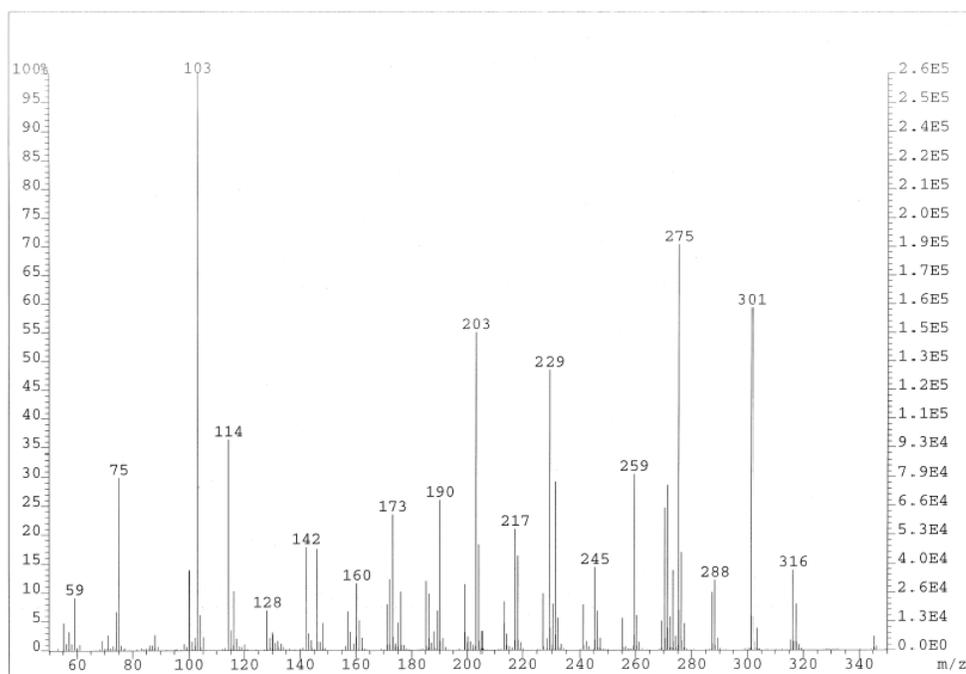


Figura 23 - Espectro de massas para o alcoxissilano sintetizado.

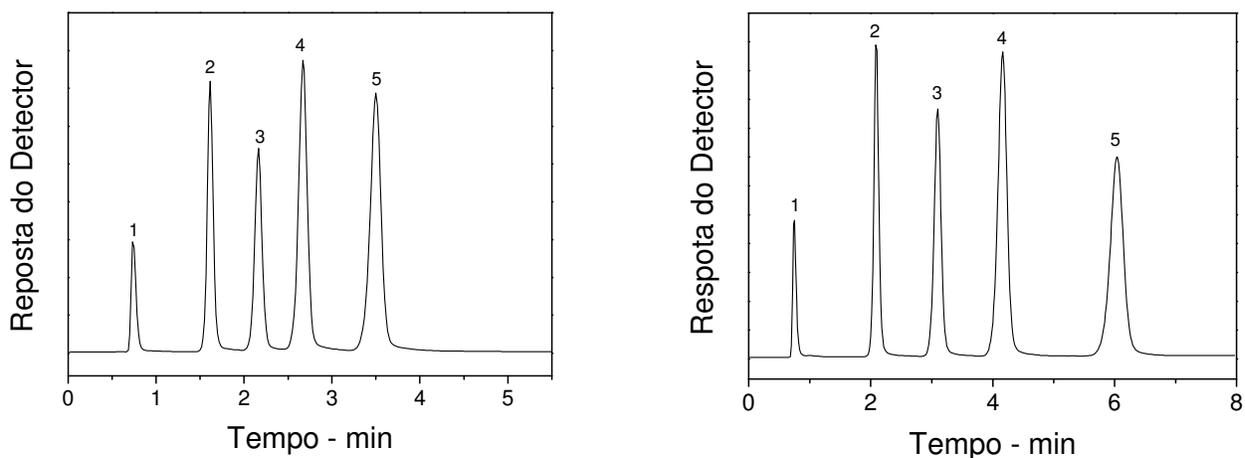
A amostra é vaporizada e convertida em íons de carga positiva através do feixe de elétrons que passa pela câmara de ionização. Quando um elétron da molécula é removido origina-se um íon de massa igual à massa da molécula que foi introduzida¹⁰⁰. O íon

originado é simbolizado por M^+ e corresponde à massa molar da molécula original. Conforme pode ser observado no espectro outros íons foram formados e muitos deles podem ter sofrido reações ou rearranjos que dificultaram a identificação estrutural de cada íon molecular formado. A massa molar obtida para o agente sililante foi de 316 m/z.

6.3 Avaliação cromatográfica com misturas testes

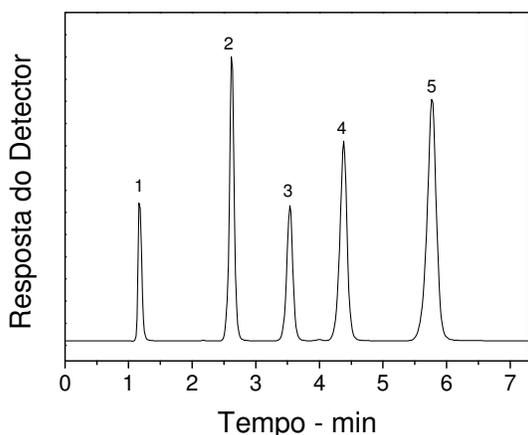
6.3.1 Avaliação cromatográfica com a mistura teste I

A etapa inicial da avaliação cromatográfica da FE Si-C8-uréia foi realizada a partir da determinação da vazão ótima de FM e da sua composição ideal. A porcentagem do componente orgânico na FM ideal para a avaliação das FE foi determinada através da injeção da mistura teste 1 (uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno)^{10,11,14,23}. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 24 e 25 para as colunas de 60 x 3,9 e 125 x 3,9 mm, respectivamente.

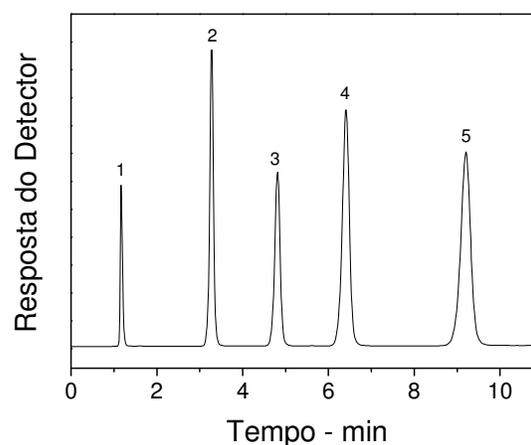


Coluna: 60 x 3,9 mm; FM ACN:H₂O 60:40 v/v; vazão 0,6 mL min⁻¹; Coluna: 60 x 3,9 mm; FM ACN:H₂O 50:50 v/v; vazão 0,6 mL min⁻¹

Figura 24 – Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste I. Condições cromatográficas: coluna de 60 x 3,9 mm recheada com a FE Si-C8-uréia; volume de injeção: 5 μ L; FM: acetonitrila: água; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos analisados: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.



Coluna: 125 x 3,9 mm; FM ACN:H₂O 60:40 v/v; vazão 0,8 mL min⁻¹



Coluna: 125 x 3,9 mm; FM ACN:H₂O 50:50 v/v; vazão 0,8 mL min⁻¹

Figura 25 – Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste I. Condições cromatográficas: colunas recheadas com a FE Si-C8-uréia; volume de injeção: 5 μ L; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos analisados: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

As FM com composições de 60:40 e 50:50 (v/v), de ACN:H₂O, foram empregadas por serem comumente utilizadas nas avaliações de FE quimicamente ligada²³. Pode-se observar por estes cromatogramas que as duas composições de FM ACN:H₂O 50:50 e 60:40 (v/v) foram adequadas para a avaliação da FE. Com estas composições de FM obtém-se um tempo adequado de análise, inferior a 7 minutos para a coluna de 60 x 3,9 mm e inferior a 10 minutos para a coluna de 125 x 3,9 mm. Nas Tabelas 7 e 8 estão os valores dos parâmetros cromatográficos obtidos para as duas dimensões de colunas empregadas, respectivamente, nas duas composições de FM analisadas. Os compostos foram separados com boa eficiência, obtendo-se valores de N/m superiores a 74000 com a composição ACN:H₂O 60:40 v/v e superiores a 69000 para a composição ACN:H₂O 50:50 v/v para a coluna de 60 x 3,9 mm. A assimetria de pico (A_s) estão próximos a 1,1 conforme é mostrado nas Tabelas 7 e 8, comprovam que os compostos foram separados com excelente simetria de pico, sem haver problemas relacionados a caudas dos picos.

Tabela 7 - Parâmetros cromatográficos obtidos com a FE Si-C8-uréia para as colunas de 60 x 3,9 mm e 125 x 3,9 mm usando FM ACN:H₂O 60:40 v/v.

Compostos	Si-C8-uréia 60 x 3,9 mm			Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm		
	Vazão 0,6 mL min ⁻¹			Vazão 0,8 mL min ⁻¹		
	k	N/m	A _S	k	N/m	A _S
Acetofenona	1,2	57198	1,6	1,1	65367	1,2
Benzeno	1,9	63893	1,1	1,8	66577	1,1
Tolueno	2,6	68632	1,2	2,5	68540	1,0
Naftaleno	3,7	74472	1,1	3,5	71769	0,9

Tabela 8 - Parâmetros cromatográficos obtidos com a FE Si-C8-uréia para as colunas de 60 x 3,9 mm e 125 x 3,9 mm usando FM ACN:H₂O 50:50 v/v.

Compostos	Si-C8-uréia 60 x 3,9 mm			Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm		
	Vazão 0,6 mL min ⁻¹			Vazão 0,8 mL min ⁻¹		
	k	N/m	A _S	k	N/m	A _S
Acetofenona	1,6	53795	1,4	1,8	62400	1,0
Benzeno	2,8	61382	1,2	3,1	65690	1,0
Tolueno	4,1	66310	1,2	4,5	66848	0,9
Naftaleno	6,3	69060	1,2	7,0	68968	0,9

Analisando as Tabelas 7 e 8 verifica-se que o emprego de FM ACN:H₂O 60:40 v/v deve ser selecionada, pois em um tempo menor, conseguiu-se uma separação adequada dos compostos analisados, com eficiência mais alta e boa simetria de picos. A vazão entre a faixa de 0,6 a 0,8 mL/min deve ser empregada por proporcionar maior eficiência e boa simetria do pico.

Na avaliação do desempenho cromatográfico com a mistura teste I foram obtidos bons resultados com a coluna preparada com a FE Si-C8-uréia quando comparada com uma coluna comercial C8 contendo também a sílica Kromasil® como suporte de dimensões de 150 x 3,9 mm. Os cromatogramas obtidos podem ser visualizados na Figura 26.

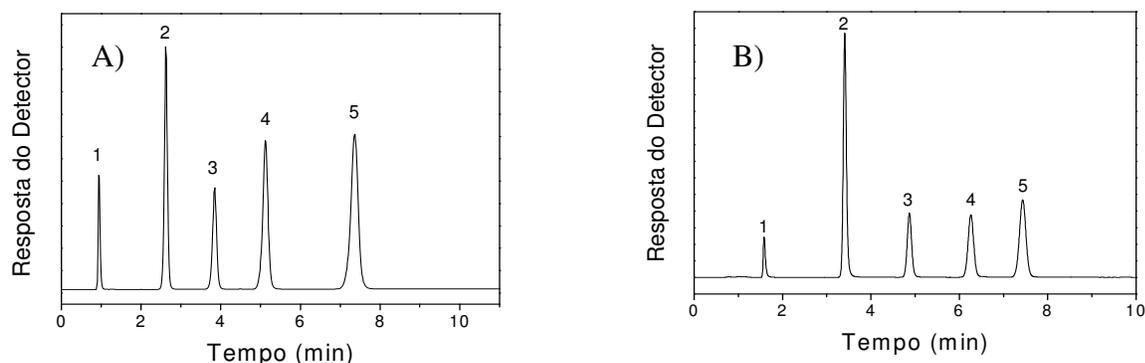


Figura 26 – Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste I. Condições cromatográficas: dimensão de coluna de 150 x 3,9 mm, FE Si-C8-uréia (A) e C8-Kromasil comercial (B); volume de injeção: 5 μ L; FM: ACN:H₂O 60:40 v/v; vazão: 1,0 mL min⁻¹; detecção UV a 254 nm e temperatura: 25 °C. Compostos analisados: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

A eficiência, expressa em pratos por metro (N/m), fator de retenção (k) e o fator de assimetria foram calculados para cada um dos solutos e estão apresentados na Tabela 9. O valor de N/m para o naftaleno obtido com a FE Si-C8-uréia foi semelhante ao da FE C8-Kromasil. Estes valores estão muito próximos aos obtidos por Silva^{10,23} de 82230 N/m para o composto naftaleno na separação da mistura usando a FE C18 dimetil uréia e superior à eficiência de 65080 N/m obtida na separação com FE C18-tiocarbamato por Silva *et al.*¹¹. Os valores de assimetria para o naftaleno estão dentro do valor aceito na literatura que é de $0,9 < A_s < 1,2$, podendo ser aceitos valores até 1,6^{17,99} e em algumas monografias da Farmacopéia Americana 2,0⁵. Ambas as colunas apresentaram bons desempenhos cromatográficos com resoluções maiores que 1,5.

Tabela 9 - Parâmetros cromatográficos da FE Si-C8-uréia e C8-Kromasil comercial para colunas de 150 x 3,9 mm.

Compostos	Si-C8-uréia			C8-Kromasil		
	k	N/m (m ⁻¹)	A _s	k	N/m(m ⁻¹)	A _s
Benzonitrila	1,7	70180	1,1	1,5	75327	1,2
Benzeno	2,9	75360	0,9	2,7	75007	1,1
Tolueno	4,2	77060	1,0	4,0	76007	1,0
Naftaleno	6,4	79367	1,0	5,0	78340	1,1

A vazão ótima da FM ACN:H₂O 60:40 (v/v) foi definida com base na curva de van Deemter, que mostra que existe uma vazão ótima (F) de FM, relacionada à velocidade linear (μ), que resulta em um valor máximo de eficiência de coluna ou em um valor mínimo de H, localizada no ponto mínimo da curva. Os termos H e μ foram obtidos a partir do valor de eficiência para o pico do naftaleno, do comprimento da coluna (L) e do tempo de retenção da uracila, Equações 7 e 8^{4,8,9,17,99}. A Figura 27 apresenta a curva de van Deemter para a determinação da vazão ótima de FM com a coluna de 150 x 3,9 mm.

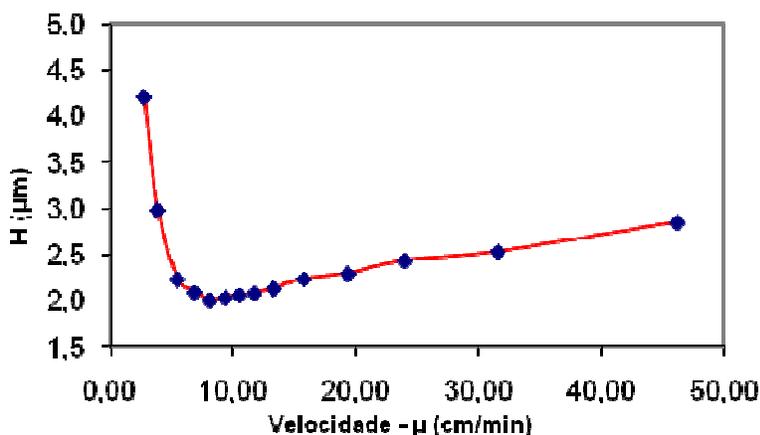


Figura 27 – Curva de van Deemter (H x μ) para o naftaleno em diferentes vazões de FM. Coluna 150 x 3,9 mm recheada com a FE Si-C8-uréia; volume de injeção 5 μL ; FM: ACN-H₂O 60:40 v/v, detecção a 254 nm e temperatura ambiente.

O ponto mínimo da curva, correspondente à máxima eficiência de coluna, apresenta altura de prato (H) equivalente a 2,0 μm (ou eficiência de coluna de 74.000 pratos m^{-1}) para o composto mais retido pela FE Si-C8-uréia avaliada. Esta máxima eficiência da FE foi obtida em vazão de FM na faixa de 0,6 a 0,8 mL min^{-1} (velocidade linear de aproximadamente 8 a 10 cm min^{-1}). A vazão de 0,8 mL min^{-1} foi escolhida para o desenvolvimento do trabalho por resultar em um tempo de análise menor para a avaliação da FE.

Analisando os valores mostrados acima, pode-se concluir que a coluna foi recheada com sucesso, obtendo separações dos compostos apolares com excelente eficiência e resolução e picos simétricos. Comparada à coluna comercial Kromasil C8 a FE Si-C8-uréia apresentou separação tão eficiente quanto à coluna comercial.

6.3.2 Avaliação cromatográfica com a mistura II

Para avaliar a interação da FE Si-C8-uréia com outros compostos ácidos e básicos foi feita a separação de uma mistura contendo uracila, fenol como composto ácido, N,N-dimetilanilina como composto básico para caracterizar a interação com os silanóis residuais e os compostos naftaleno e acenafteno como substâncias apolares para avaliação da hidrofobicidade¹⁴. Na Figura 28, que apresenta o cromatograma obtido na separação dessa mistura teste II, com a coluna de 125 x 3,9 mm recheada com a FE Si-C8-uréia, pode ser verificado que todos os compostos foram separados com boa eficiência e com picos simétricos.

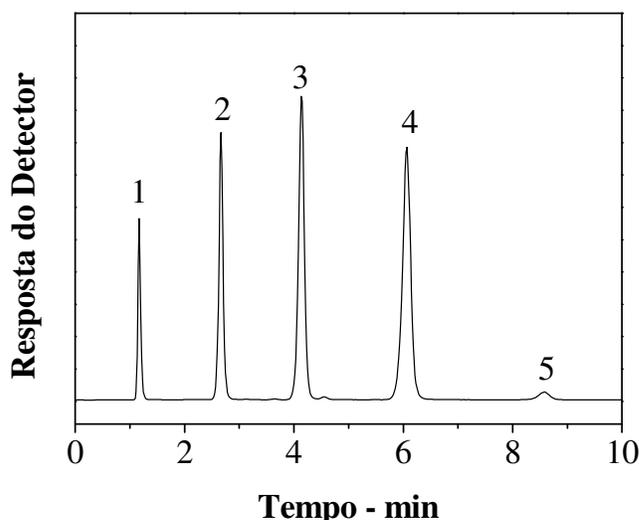


Figura 28. Cromatograma obtido na separação da mistura II. Condições cromatográficas: Coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; volume de injeção: 5 μ L; FM ACN:H₂O (60:40, v/v), vazão 0,8 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

O composto N,N-dimetilanilina, por ser uma substância de característica básica, pode interagir com os silanóis residuais presentes na superfície da sílica e apresentar um pico com cauda elevada¹⁴. Na separação desse composto na FE Si-C8-uréia, o valor de assimetria obtido foi de 1,0, mostrando que a fase apresenta baixa interação de compostos básicos com silanóis residuais. Esse valor de assimetria também pode ser considerado um indicador de baixa atividade silanofílica, confirmando os dados obtidos por RMN de ²⁹Si e espectroscopia de infravermelho na avaliação da FE Si-C8-uréia, após a reação de

capeamento. Os resultados obtidos na separação da mistura II com a coluna de 125 x 3,9 mm, recheada com a FE Si-C8-uréia, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura II com a FE Si-C8-uréia.

Composto	t _R (min)	A _S	N/m
1 - Uracila	1,2	1,3	19228
2 - Fenol	2,7	1,0	47531
3 - N,N-DMA	4,1	1,0	60500
4 – Naftaleno	6,1	0,9	63177
5 -Acenafteno	8,6	0,9	65448

6.3.3 Avaliação cromatográfica com a mistura teste de Neue

A Figura 29 apresenta os cromatogramas obtidos na separação da mistura de Neue *et al.*⁵⁴, usando a FE Si-C8-uréia, a FE comerciais LiChrosphere[®] 100 RP8 não capeada (C8ne) e LiChrosphere[®] 100 RP8e capeada (C8e).

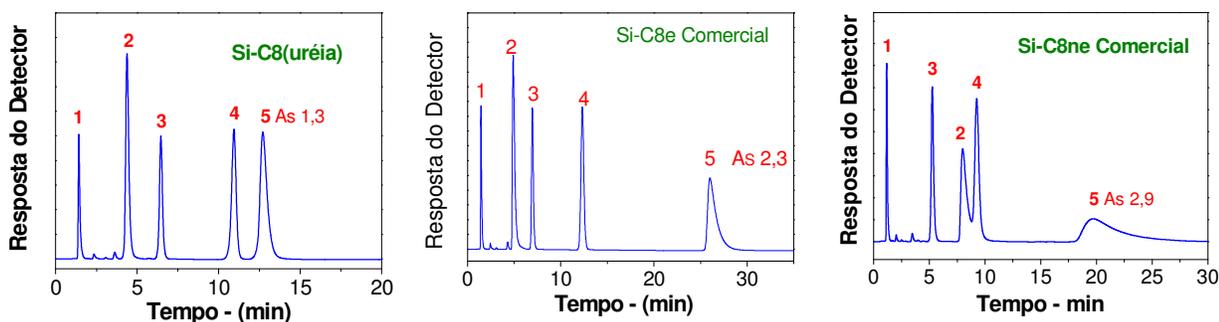


Figura 29 – Cromatogramas obtidos na separação dos componentes da mistura de Neue. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; FM: MeOH:20 mmol L⁻¹ K₂HPO₄, pH 7,0 (65:35, v/v), vazão: 0,8 mL min⁻¹; detecção UV a 254 nm; temperatura: 25 °C; compostos: (1) uracila, (2) propranolol, (3) naftaleno, (4) acenafteno e (5) amitriptilina.

As Tabelas 11 e 12 apresentam os parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura de Neue *et al.*⁵⁴, usando a FE Si-C8-uréia e uma FE LiChrosphere[®] 100 RP8e capeada comercial e uma FE LiChrosphere[®] 100 RP8 comercial não capeada. Nota-se que na coluna contendo a FE Si-C8-uréia, os compostos foram separados com boa resolução, eficiência satisfatória e baixo alargamento de pico, inclusive para os analitos básicos.

Tabela 11 - Parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura de Neue com a FE Si-C8-uréia.

Compostos	Si-C8-uréia (125 x 3,9 mm)			
	<i>k</i>	N/m	<i>A_S</i>	<i>R_S</i>
Propranolol	2,08	20288	1,3	11,4
Naftaleno	3,55	48288	1,1	6,1
Acenafteno	6,70	56912	0,9	10,5
Amitriptilina	7,95	38864	1,3	2,7

Tabela 12 - Parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura de Neue com a FE comercial LiChrosphere[®] 100 RP8 e LiChrosphere[®] 100 RP8e.

Compostos	LiChrosphere [®] 100 RP8e 125 x 4,0 mm				LiChrosphere [®] 100 RP8 125 x 4,0 mm			
	<i>k</i>	N/m	<i>A_S</i>	<i>R_S</i>	<i>k</i>	N/m	<i>A_S</i>	<i>R_S</i>
Propranolol	2,4	16784	1,5	11,4	3,5	23440	1,6	14,8
Naftaleno	3,9	48016	1,2	5,2	5,8	Nd	Nd	4,4
Acenafteno	7,6	57080	1,1	11,4	6,9	21640	Nd	1,8
Amitriptilina	17,2	35344	2,3	12,8	15,9	Nd	2,9	6,9

Nd – não calculado

Silva *et al.*¹⁰ obtiveram valor de TF de 1,59 para a amitriptilina na separação da mistura teste de Neue usando a FE C18-dimetil-uréia. Neue *et al.*¹⁰¹ avaliaram a FE Symmetry C18 e obtiveram valor de TF de 2,1 usando condições cromatográficas semelhantes. Silva *et al.*¹¹ obtiveram valor de TF de 1,67 para a amitriptilina na separação da mistura teste de Neue usando a FE C18-tiocarbamato e compararam com FE C18 não capeada, que forneceu TF de 5,23. A eficiência obtida com a coluna contendo a FE com grupo polar foi maior quando comparada com a FE C18 comum.

Na FE C8 comercial capeada, todos os compostos foram bem separados com eficiência, fator de assimetria e ordem de eluição similares à FE Si-C8-uréia, entretanto, o composto básico amitriptilina apresentou tempo de retenção e fator cauda maiores. As melhores simetrias para os compostos básicos obtidas na fase Si-C8-uréia, comparada com a FE C8e comercial pode ser atribuída à presença do grupo polar uréia embutido na cadeia alquila da FE, que promove a redução da atividade dos silanóis residuais^{19,33}. Outra explicação que pode ser dada para a melhor separação com a FE Si-C8-uréia é o alto

recobrimento da superfície e também o emprego de um silano monofuncional na modificação da superfície da sílica, evitando maior número de silanóis residuais na superfície da sílica por hidrólise¹⁰.

Os compostos básicos amitriptilina, $pK_a > 9,4$ e propranolol da mistura teste de Neue em pH 7,0 encontram-se protonados na forma BH^+ e podem interagir através da interação por troca iônica, com silanóis residuais que devem estar desprotonados na forma de $\equiv SiO^-$ ^{10,13}. Conforme, mostrado na Figura 29, nas separações com as FE C8 comerciais, a cauda resulta em interação indesejável entre os grupos silanóis residuais da superfície da sílica e o composto básico.

Os valores de fator de assimetria para o propranolol e amitriptilina, obtidos na separação com a FE Si-C8-uréia, foram inferiores e melhores que os valores obtidos com as FE C8 capeada e C8 não capeada, devido à supressão da troca iônica pela redução do acesso ao silanol residual, conforme mostrado na Tabela 11. Observa-se que o fator de assimetria é maior para a FE C8 comercial não capeada, que possui maior quantidade de silanóis residuais.

A coluna recheada com a FE LiChrosphere[®] 60 Select B foi avaliada na separação dos compostos presentes na mistura de Neue⁵⁴. A Figura 30 apresenta o cromatograma obtido na separação da mistura teste de Neue⁵⁴ com a coluna recheada com a FE LiChrosphere[®] 60 Select B e a FE Si-C8-uréia.

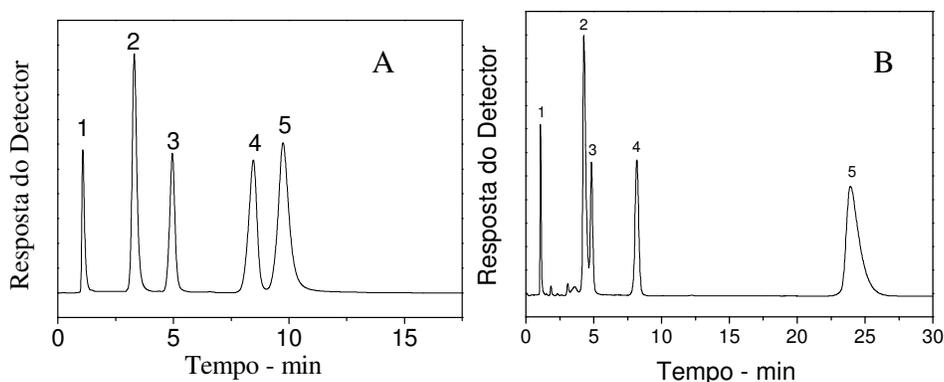


Figura 30 – Cromatogramas obtidos na separação dos componentes da mistura de Neue. Condições cromatográficas: A) FE Si-C8-uréia, 60 x 3,9 mm e B) LiChrosphere[®] 60 Select B, 60 x 3,9 mm; volume de injeção 5 μ L; FM MeOH: K_2HPO_4 20 mmol L^{-1} pH 7,0 (65:35, v/v), vazão: 0,6 mL; temperatura: 25 $^{\circ}C$; min^{-1} ; detecção UV: 254 nm; Compostos: (1) uracil, (2) propranolol, (3) naftaleno, (4) acenafteno e (5) amitriptilina.

Os valores dos parâmetros cromatográficos estão apresentados na Tabela 13. Observou-se que a amitriptilina apresentou fator de assimetria elevado e tempo de retenção maior na coluna Select B que o obtido com a FE Si-C8-uréia de dimensões de 60 x 3,9 mm.

Tabela 13 - Parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura de Neue com a FE Si-C8-uréia e LiChrosphere® 60 Select B.

Compostos	Si-C8-uréia, 60 x 3,9 mm				Select B 60, x 3,9 mm			
	<i>k</i>	N/m	A _S	R _S	<i>k</i>	N/m	A _S	R _S
Propranolol	2,1	16888	1,4	10,4	3,0	14856	NC	11,7
Naftaleno	3,6	41272	1,1	5,5	3,3	30816	NC	1,6
Acenafteno	6,7	50144	1,0	9,8	6,2	36296	1,0	8,4
Amitriptilina	8,0	29824	1,3	2,6	20,2	24680	1,8	14,3

* NC – Não calculado.

A FE LiChrosphere® 60 Select B é considerada específica para separação de compostos de caráter básico¹⁰², com espessura de camada de 3,55 $\mu\text{mol m}^{-2}$ e porcentagem de carbono de 11,5 %. Estes valores são semelhantes aos obtidos neste trabalho para a FE Si-C8-uréia de 3,2 $\mu\text{mol m}^{-2}$ para recobrimento e 13,1 % de carbono. A separação obtida com a FE Si-C8-uréia apresentou melhor eficiência, menor assimetria para o pico de amitriptilina e menor tempo de análise.

Dessa forma, a coluna preparada neste trabalho apresentou desempenho superior a coluna comercial, LiChrosphere® 60 Select B, indicada para ser usada na análise de compostos básicos e também às colunas comerciais LiChrosphere® 100 RP8 e LiChrosphere® 100 RP8e utilizadas no teste. As separações obtidas com a FE Si-C8-uréia apresentaram boa eficiência e resolução, picos simétricos com cauda reduzida, principalmente para os compostos básicos e tempos de análise menores. Os melhores resultados obtidos na separação dos compostos básicos com a Fe Si-C8-uréia são devidos a redução da influência dos grupos silanóis residuais, tanto pela presença do grupo polar quanto pelo processo de capeamento, que mudaram a superfície do suporte cromatográfico.

6.3.4 Avaliação cromatográfica com a mistura teste de Engelhardt e Jungheim

Na avaliação do desempenho cromatográfico da mistura teste de Engelhardt e Jungheim⁵², Figura 31, foram obtidos bons resultados com a coluna de 125 x 3,9 mm recheada com a FE Si-C8-uréia.

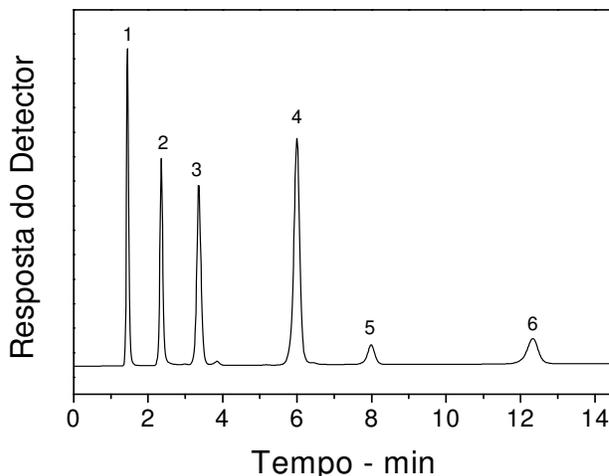


Figura 31 – Cromatograma obtido na separação da mistura teste de Engelhardt e Junheim: Condições cromatográficas: coluna:125 x 3,9 mm; FE Si-C8-uréia; FM: MeOH:H₂O 55:45 (v/v) vazão: 0,8 mL min⁻¹; volume de injeção: 5 µL; detecção UV a 254 nm e temperatura de 40 °C; compostos: (1) uracila, (2) anilina, (3) fenol, (4) N,N-dimetilanilina, (5) tolueno, (6) etilbenzeno.

Os parâmetros cromatográficos calculados para a mistura de Engelhardt foram úteis para avaliar, a partir dos fatores de retenção do etilbenzeno e tolueno, a seletividade hidrofóbica da FE Si-C8-uréia ($\alpha_{CH2} = k_{\text{etilbenzeno}}/k_{\text{tolueno}}$). O valor do fator de separação entre o etilbenzeno e tolueno foi de $\alpha_{E/T} = 1,66$ e entre o tolueno e N,N-dimetilanilina foi de $\alpha_{T/DMA} = 1,44$. Estes valores mostraram que a FE contendo grupo polar uréia embutido na cadeia carbônica seguida pelo capeamento contém um número menor de silanóis residuais, o que diminuiu as interações destes grupos com os compostos básicos presentes na mistura. Os valores para o fator de separação entre etilbenzeno e tolueno e entre o tolueno e N,N-dimetilanilina foram semelhantes aos obtidos por Silva *et al.*¹¹, utilizando uma coluna recheada com FE contendo grupo carbamato embutido na cadeia alquila ($\alpha_{E/T} = 1,66$ e $\alpha_{T/DMA} = 1,41$). As eluições da anilina antes do fenol e N,N-dimetilanilina antes do tolueno e

etilbenzeno são considerados indicadores da redução da atividade silanofílica, confirmada pelo valor do fator de assimetria de 0,91 obtido para a N,N-DMA.

Nas Tabelas 14 e 15 são apresentados os parâmetros cromatográficos obtidos para a separação dos compostos da mistura de Engelhardt e Junheim⁵² com a FE Si-C8-uréia de dimensões de 125 x 3,9 mm.

Tabela 14 - Parâmetros cromatográficos obtidos para a FE Si-C8-uréia na separação da mistura de Engelhardt e Junheim.

Composto	t_R (min)	N/m	A_S	R_s
Uracila	1,5	21910	1,1	-----
Anilina	2,4	36322	1,1	7,3
Fenol	3,4	34099	1,1	5,8
N,N-DMA	6,0	55665	0,9	7,9
Tolueno	8,0	62513	0,9	6,2
Etilbenzeno	12,3	62033	0,9	9,5

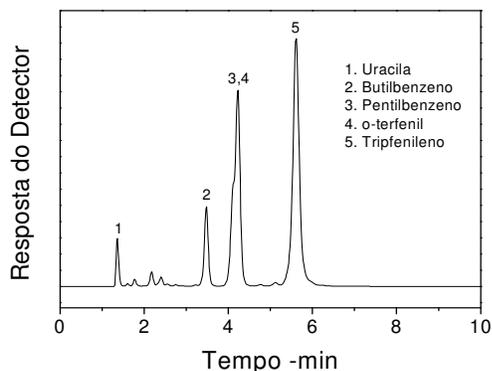
Tabela 15 – Parâmetros cromatográficos de avaliação da mistura de Engelhardt e Junheim obtidos com a FE Si-C8-uréia.

Vazão (mL/min)	k_{etil}	k_t	k_{DMA}	$\alpha_{etil/t}$	$\alpha_{t/DMA}$
0,8	7,50	4,50	3,13	1,66	1,44
1,0	7,44	4,47	3,11	1,66	1,44

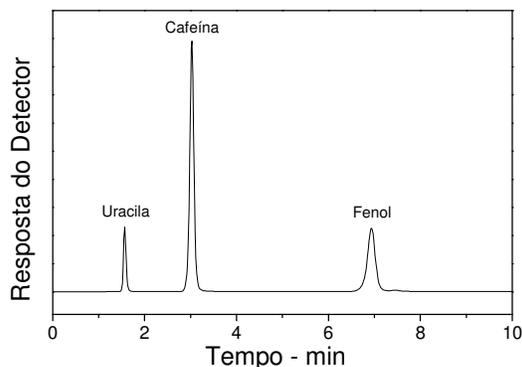
Os compostos da mistura teste de Engelhardt e Junheim foram separados com eficiência e excelente assimetria, indicando a baixa atividade silanofílica da FE Si-C8-uréia.

6.3.5 Avaliação cromatográfica com a mistura teste de Tanaka

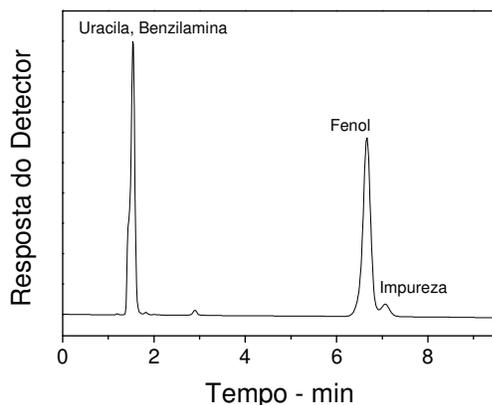
As separações obtidas com as misturas de Tanaka *et al.*⁵³ fornecem valores de parâmetros cromatográficos que são importantes para caracterizar a nova FE desenvolvida. Os cromatogramas obtidos na separação das misturas de Tanaka estão apresentados na Figura 32 e alguns parâmetros cromatográficos obtidos com esta mistura estão na Tabela 16.



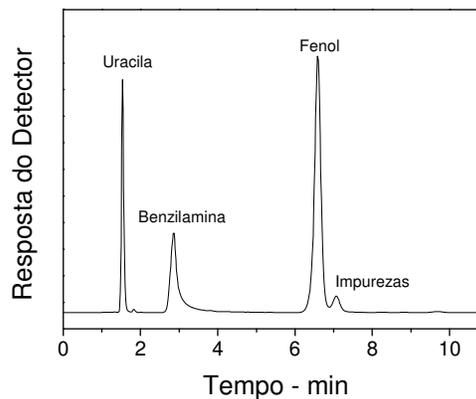
A) Mistura I – Tanaka: FM: MeOH:H₂O (80:20, v/v)



B) Mistura II – Tanaka: FM: MeOH:H₂O (30:70, v/v)



C) Mistura III – Tanaka: FM: MeOH:tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (30:70, v/v) - pH 2,7



D) Mistura IV – Tanaka: FM:MeOH:tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (30:70, v/v) - pH 7,6

Figura 32 – Cromatogramas obtidos na separação dos compostos das misturas testes de Tanaka na FE Si-C8-uréia, Condições cromatográficas: coluna 125 x 3,9 mm; FM vazão: 0,8 mL min⁻¹; volume de injeção: 5 µL; detecção UV a 254 nm e temperatura: 40 °C.

Tabela 16 - Parâmetros cromatográficos da FE Si-C8-uréia obtidas pelo protocolo de Tanaka.

Fase	k _{pb}	α _{CH2}	α _{T/O}	α _{C/P}	α _{B/P} pH 7,6	α _{B/P} pH 2,7
Si-C8-uréia	2,1	1,4	1,5	0,27	3,8	*

(*) não foi possível obter o parâmetro devido a coeluição da benzilamina e uracila.

Nota-se no cromatograma da mistura I, Figura 32A, que os picos de butilbenzeno e pentilbenzeno apresentaram boa separação. A eluição dos compostos presentes na mistura I de Tanaka⁵³ fornece informações sobre a hidrofobicidade ($k_{\text{pentilbenzeno}}$), a seletividade hidrofóbica (α_{CH_2}) e a seletividade espacial ($\alpha_{\text{T/O}}$) da FE Si-C8-uréia.

O fator de separação (α_{CH_2}) para o pentilbenzeno ($k_{\text{pentilbenzeno}}$) e butilbenzeno ($k_{\text{butilbenzeno}}$) representa a seletividade hidrofóbica da coluna devido à variação na retenção causada por cada grupo CH_2 adicional e depende do recobrimento da superfície e também do comprimento da cadeia alquila do silano. O valor obtido para a seletividade hidrofóbica da FE Si-C8-uréia, α_{CH_2} igual a 1,4, se encontra dentro da faixa determinada para FE comerciais à base de C8 e C18 quimicamente ligados à superfície de sílica nua. Silva *et al.*¹¹ obtiveram valor para α_{CH_2} de 1,40 para FE C18 com grupo polar tiocarbamato. Euerby e Petersson³³ obtiveram resultados para α_{CH_2} de 1,26 e 1,32 para as FE XTerra RP8 e Symmetry Shield RP8, respectivamente e classificaram estas FE com grupo polar embutido que foram obtidas em apenas uma etapa de reação, como sendo de baixa capacidade de troca iônica, moderada hidrofobicidade e alta seletividade fenólica e estérica.

A hidrofobicidade foi avaliada pelo valor do fator de retenção para o composto pentilbenzeno ($k_{\text{pentilbenzeno}}$), para a FE Si-C8-uréia que foi de 2,1. Este valor também se encontra dentro da faixa determinada para FE comerciais à base de C8 e C18 quimicamente ligados à superfície de sílica nua, entretanto um pouco inferior devido à característica mais polar do grupo uréia embutido na cadeia alquila quando comparado à uma FE C8 comercial comum. O valor obtido para a FE Si-C8-uréia ficou próximo dos resultados obtidos por Euerby e Petersson³³ de 2,30 para a FE Symmetry Shield RP8 e distante do valor 1,10 para a FE XTerra RP8. Como a avaliação da retenção do pentilbenzeno reflete as características da densidade do ligante na superfície do suporte, conseqüentemente, o recobrimento aponta que a FE Si-C8-uréia é mais semelhante à Symmetry Shield RP8.

A seletividade espacial foi avaliada pelo fator de separação ($\alpha_{\text{T/O}}$) do o-terfenil, composto não planar, e do trifenileno um composto altamente planar. A FE Si-C8-uréia apresentou boa seletividade estérica devido à boa resolução obtida entre os picos o-terfenil e trifenileno como pode ser observado pelo valor de $\alpha_{\text{T/O}}$ 1,5 e semelhante aos resultados obtido por Euerby e Petersson³³ de $\alpha_{\text{T/O}}$ de 1,73 e 1,87 para as FE XTerra RP8 e

Symmetry Shield RP8, respectivamente. Silva *et al.*¹¹ obtiveram valor para $\alpha_{T/O}$ de 1,36 para FE C18 com grupo polar tiocarbamato.

A mistura II do protocolo de Tanaka⁵³ fornece informação da capacidade de ligação de hidrogênio da FE obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol ($\alpha_{C/P}$). Este teste mostra poucas interações de ligação de hidrogênio entre cafeína e os grupos silanóis residuais presentes na superfície da sílica. Os compostos foram bem separados na FM sem tampão, como pode ser visto na Figura 32B, com valor de $\alpha_{C/P}$ de 0,27 similar aos resultados obtidos por Euerby e Petersson³³ de $\alpha_{C/P}$ de 0,30 e 0,27 para as FE XTerra RP8 e Symmetry Shield RP8, respectivamente. Silva *et al.*¹¹ obtiveram valor para $\alpha_{C/P}$ de 0,43 para FE C18 com grupo polar tiocarbamato. A menor retenção da cafeína e sua eluição antes do fenol na FE Si-C8-uréia indica uma baixa atividade dos grupos silanóis obtida através do processo de capeamento ou devida a proteção dos silanóis pelos grupos uréias embutidos na cadeia carbônica. A maior retenção do fenol sugere uma alta atividade de ligação de hidrogênio, devida à maior eletronegatividade do átomo de nitrogênio presente no grupamento uréia embutido na cadeia carbônica.

As misturas III e IV do protocolo de Tanaka⁵³ foram separadas na FE Si-C8-uréia, Figura 32C e 32D, que permitiram a determinação da atividade silanofílica total e da acidez dos grupos silanóis residuais da fase, respectivamente. As misturas são constituídas de uma base forte (benzilamina, pKa 9,4) e um composto ácido (fenol) que são analisados em FM tamponadas, fosfato 20 mmol L⁻¹, com valores diferentes de pH, (mistura III: pH 2,7 e mistura IV: pH 7,6). Na FM com pH de 2,7, os grupos silanóis não estão dissociados, enquanto a benzilamina está protonada e carregada positivamente. Analisando as separações em pH 2,7, apresentada na Figura 32C, conclui-se que a interação de troca iônica não ocorre e que a benzilamina protonada elui juntamente com o composto uracila, usado como composto não retido. Euerby e Petersson³³ obtiveram resultados para $\alpha_{B/P}$ entre 0,02 a 0,31 para todas as FE avaliadas e de 0,07 e 0,04 para as FE XTerra RP8 e Symmetry Shield RP8, respectivamente. Estes resultados também indicam que o composto benzilamina não apresentou retenção satisfatória.

Na separação da mistura IV de Tanaka⁵³ em pH 7,6, Figura 32D, os grupos silanóis devem estar desprotonados (Si-O⁻) e, podem, desta forma, interagir com a benzilamina protonada, aumentando as interações de troca iônica indesejáveis. O valor de $\alpha_{B/P}$ obtido, 3,81, indica boa separação entre os compostos. O valor do fator de assimetria para a

benzilamina de 1,8 indica que possivelmente pode estar ocorrendo interação com os silanóis residuais, entretanto, de forma geral, pode-se considerar que o capeamento e o grupo uréia embutido possuem função de proteção dos grupos silanóis. Estes resultados são comparáveis aos obtidos por Silva *et al.*¹¹ de $\alpha_{B/P}$ de 2,5 e fator de assimetria de 1,2 para benzilamina na separação da mistura teste de Tanaka com a FE com grupo polar tiocarbamato embutido na cadeia alquila C18.

6.4 Avaliação da Estabilidade Química da FE

Os parâmetros cromatográficos utilizados para monitorar o comportamento da coluna Si-C8-uréia durante o estudo de estabilidade foram: eficiência (N/m), fator de retenção (k), fator de assimetria (A_S) e resolução (R_S).

Os resultados obtidos no teste de estabilidade para a coluna Si-C8-uréia de dimensões de 125 x 3,9 mm estão apresentados nas Figuras 33 a 36.

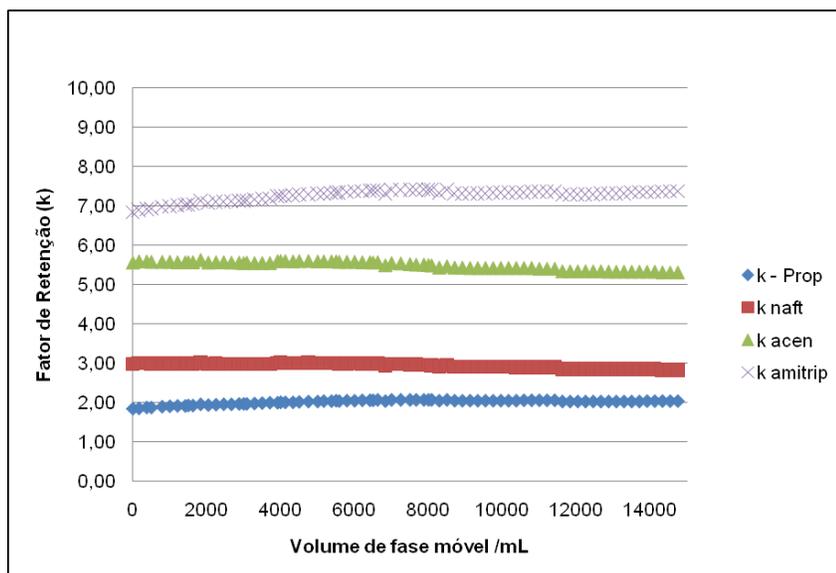


Figura 33 – Gráfico para a avaliação do fator de retenção na estabilidade da FE Si-C8-Uréia.

A retenção do naftaleno durante o teste de estabilidade é uma boa medida da hidrofobicidade da FE. O fator de retenção para amitriptilina e propranolol são conhecidos por serem influenciados pela presença dos grupos silanóis residuais em pH 7,0, e ser útil para medir a população destes grupos na superfície da sílica durante o estudo de estabilidade.

Através da avaliação da Figura 33, verifica-se que os fatores de retenção para os compostos da mistura teste, apresentaram pequenas alterações até a passagem de aproximadamente 14500 mL de FM. Houve um pequeno aumento nos fatores de retenção para os compostos básicos propranolol e amitriptilina, que pode ser indicativo do aumento no número de silanóis residuais com uma maior interação com os compostos básicos. Estes resultados podem representar um início da degradação da FE.

A partir da avaliação da Figura 34, observa-se que os valores do fator de assimetria sofreram um ligeiro declínio, seguido de um aumento, que foi mais pronunciado para o composto amitriptilina em virtude do acréscimo das interações dos grupos silanóis com o analito básico, em especial a amitriptilina, fazendo com que esse composto ficasse mais retido na FE. Os resultados indicam que pode ter ocorrido um aumento no número de silanóis residuais devido ao processo de lixiviação e dissolução da sílica, com possível alteração no leito cromatográfico e também a perda do agente sililante pelo volume excessivo de fase móvel eluída pela coluna.

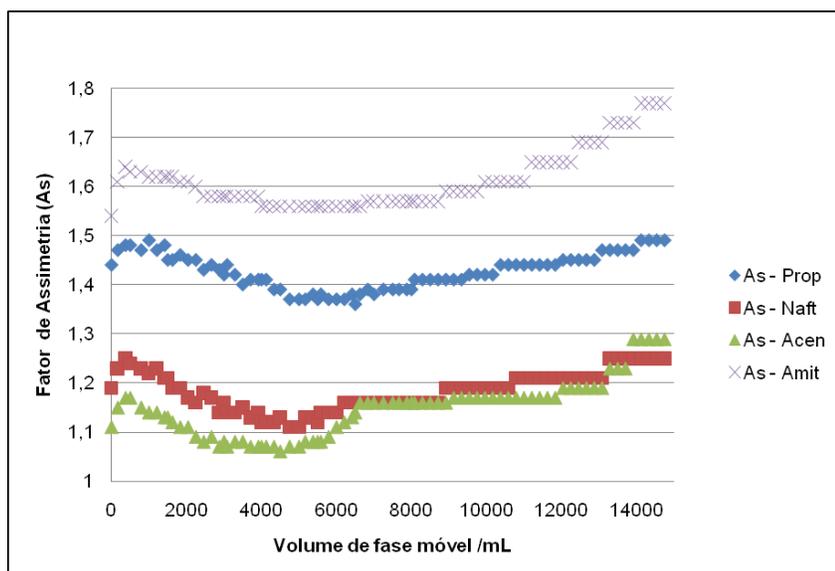


Figura 34 – Gráfico para a avaliação do fator de assimetria na estabilidade da FE Si-C8-Uréia.

Para uma melhor avaliação da estabilidade da FE se faz necessário calcular a eficiência, Figura 35, que diminuiu após a passagem de 5000 mL de FM. O declínio da eficiência da coluna é indicativo de uma possível alteração no leito da coluna, causada provavelmente pela dissolução da sílica.

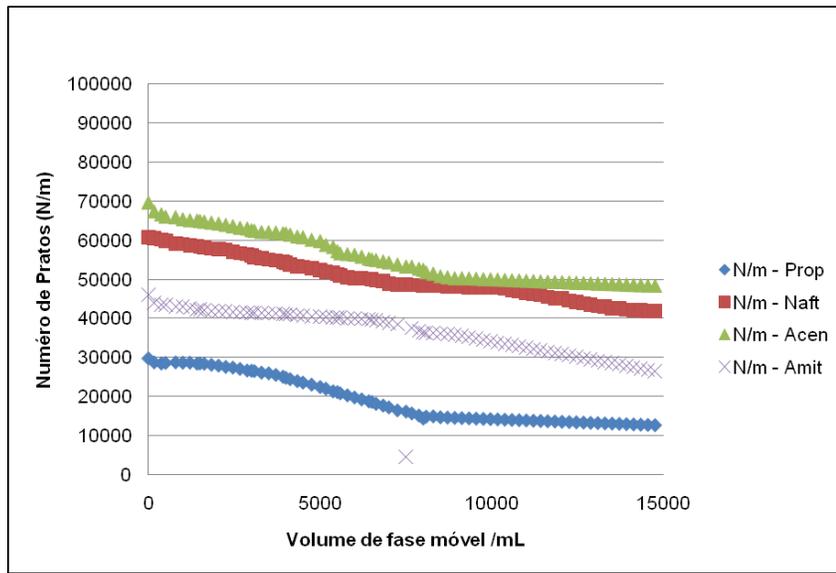


Figura 35 – Gráfico para a avaliação da eficiência na estabilidade da FE Si-C8-Uréia.

A avaliação da resolução, Figura 36, mostra que possivelmente devido ao aumento do alargamento dos picos, em virtude de uma maior interação do analito com a FE, houve uma redução significativa na resolução entre os compostos até a passagem de 7000 mL de FM. Após esse volume houve uma estabilização de resolução.

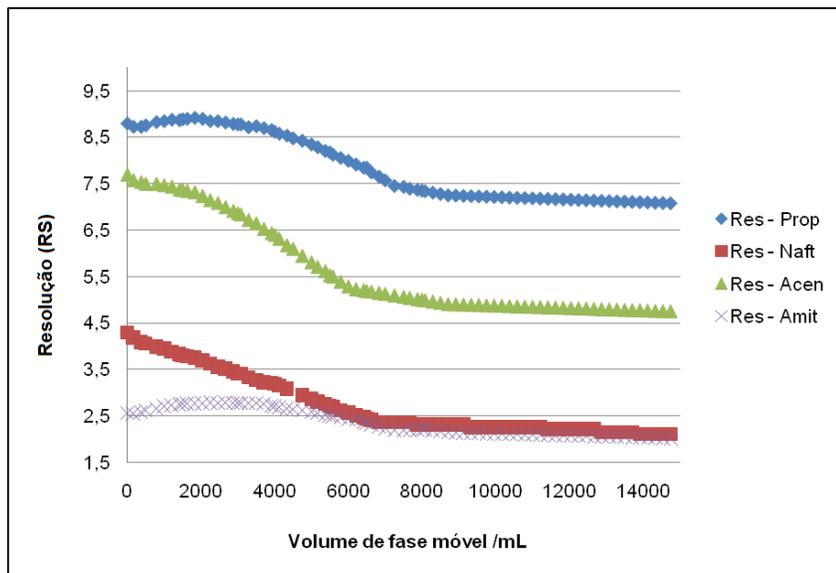


Figura 36 – Gráfico para a avaliação da resolução na estabilidade da FE Si-C8-Uréia.

Apesar das alterações nos parâmetros cromatográficos observados durante o estudo de estabilidade da FE Si-C8uréia, os resultados foram satisfatórios uma vez que foi utilizada uma FM com presença de tampão fosfato que pode acelerar a hidrólise e dissolução da sílica, quando comparado a outras FM preparadas apenas com água e modificador orgânico. Os resultados obtidos no estudo de estabilidade da FE Si-C8-uréia foram semelhantes aos obtidos por Silva *et al.*,²⁴ na avaliação da estabilidade da FE C18 uréia utilizando a mistura teste de Neue até a passagem de 20000 volumes de FM.

As FE contendo grupo polar embutidos podem apresentar um maior grau de hidratação devido à habilidade dos grupos polares de manter ligações de hidrogênio com as moléculas de água e, provavelmente, a superfície da sílica esteja mais susceptível às interações com os ânions fosfatos da FM²³. Desta forma, a hidrólise das ligações siloxanos pode ser facilitada, aumentando a solubilidade da sílica, e o uso de tampões, como o fosfato, deve ser evitado para que o tempo de vida útil da FE com grupo polar seja maior.

Outro fator importante foi a utilização de compostos básicos presentes na mistura de Neue como a amitriptilina e propranolol que podem interagir com os silanóis residuais da superfície da sílica. Os resultados obtidos comprovaram o bom desempenho da FE Si-C8-uréia no estudo de estabilidade.

6.5 Conclusão

O método de preparação do novo agente sililante monofuncional forneceu uma nova FE contendo grupo polar do tipo uréia inserido na cadeia orgânica C8. Os resultados obtidos com os testes de caracterização de análise elementar, infravermelho, RMN ¹³C, ¹H, ²⁹Si confirmaram que o agente sililante foi preparado e imobilizado com sucesso na superfície da sílica. A reação de capeamento da FE Si-C8-uréia foi confirmada pelos testes de caracterização de análise elementar, infravermelho, RMN ¹³C e ²⁹Si. O processo de capeamento permitiu uma menor interação dos compostos básicos presentes nas amostras com os silanóis residuais, que foram parcialmente bloqueados com a mistura de TMCS/HMDS. A FE Si-C8-uréia mostrou-se eficiente na separação de misturas testes de hidrocarbonetos aromáticos, Neue, Engelhardt e Tanaka. Entre estes compostos, os fármacos básicos como a amitriptilina e propranolol foram separados com melhor ou semelhante eficiência e simetria quando comparadas à FE comerciais LiChrosphere® 60 Select B e LiChrosphere® 100 RP8 e RP8e. Nas separações realizadas com a FE Si-C8-

uréia, os picos eluíram em menor tempo, comparada as FE C8 comerciais, proporcionando corridas mais rápidas, com possibilidade do uso de FM com maior proporção aquosa e, como consequência a economia de modificador orgânico e menor quantidade de resíduo formado. A FE apresentou eficiência semelhante na separação de misturas testes quando comparada a outras FE com grupo polar embutido. O teste de estabilidade mostrou que a coluna recheada com a FE Si-C8-uréia pode ser usada até cerca de 7000 volumes de coluna, sem que a eficiência sofra alteração significativa, com fator de assimetria de pico dentro de valores aceitáveis.

Capítulo IV

Aplicação da FE na Separação de Fármacos e Outros Compostos Presentes em Formulações Farmacêuticas

1. Introdução

A FE C8-uréia foi avaliada na separação de compostos com características ácidas e principalmente básicas, com relação à interação desses compostos com os grupos silanóis residuais presentes na superfície da sílica. As separações foram realizadas com o objetivo de aprimoramento dos métodos farmacopéicos, visando a redução ou até eliminação do uso de tampão e também para verificar a aplicabilidade da FE Si-C8-uréia na separação de fármacos em métodos farmacopéicos. A aplicação na separação do composto ativo em produtos farmacêuticos avaliou a possibilidade da separação dos ativos na presença de interferentes como os excipientes e impurezas.

Os compostos avaliados foram principalmente fármacos no estado puro, mas também em produtos farmacêuticos como cápsulas, comprimidos, cremes, xaropes e soluções orais. Os fármacos avaliados foram: furoato de mometasona em creme, clonazepam e compostos relacionados em comprimidos, clortalidona em comprimidos, mistura de alquilparabenos, dropropizina em xarope, mistura de paracetamol, cafeína e ácido acetilsalicílico, mistura de cefalexina, prilocaína e amitriptilina e mistura de benzodiazepínicos.

2. Parte Experimental

2.1. Materiais

2.1.1. Equipamentos

- 🚩 Cromatógrafo a líquido, Shimadzu, composto de uma bomba de alta pressão, Shimadzu modelo LC-10 AD; detector espectrofotométrico de absorção no UV-Vis de comprimento de onda variável, Shimadzu modelo SPD-10 AV; válvula de injeção (alça de amostragem 5 μ L), Rheodyne modelo 8125; Software usado para aquisição de dados ChromPerfect for Windows 3.52.
- 🚩 Cromatógrafo a líquido, Merck-Hitachi Elite, composto de uma bomba de alta pressão de quatro canais L-7130, forno Merck-Hitachi L-2300, injetor automático Merck-Hitachi L-2200, detector por arranjo de diodo Merck-Hitachi L-2450 e software EZChrom .

2.1.2. Reagentes

- Acetonitrila, grau HPLC, Tedia.

- Ácido Acetilsalicílico, doado pela Medley.
- Água deionizada, Milli-Q.
- Alprazolam, doado pela Medley.
- Butilparabeno p.a., Merck.
- Cafeína p.a., Aldrich.
- Cefalexina, doado pela Medley.
- Clonazepam, doado pela Sintefina.
- Clonazepam Composto Relacionado A, Padrão USP.
- Clonazepam Composto Relacionado B, Padrão USP.
- Cloridrato de Amitriptilina, doado pela Medley.
- Clordiazepóxido, doado pela Medley.
- Clortalidona, doado pela Medley.
- Diazepam, doado pela Medley.
- Dropropizina, doado pela Medley.
- Etilbenzeno p.a., Merck.
- Etilparabeno p.a., Merck.
- Furoato de Mometasona, doado pela Medley.
- Metanol, grau HPLC, Tedia.
- Metilparabeno p.a., Merck.
- Paracetamol, doado pela Medley.
- Prilocaína, doado pela Medley.
- Propilparabeno p.a., Merck.
- Tetraidrofurano, grau HPLC, Tedia.
- Trietilamina p.a., Merck.

2.1.3. FE e colunas comerciais

- Lichrosorb[®] 60 Select B, Merck, FE constituída por partículas esféricas, diâmetro médio de 5 µm e dimensão da coluna de 60 x 3,9 mm de d.i..
- Lichrosorb[®] 100 RP8, Merck, FE constituída por partículas esféricas, diâmetro médio de 5 µm e dimensão da coluna de 125 x 4,0 mm de d.i..
- Purospher Star[®] RP8e, Merck, FE constituída por partículas esféricas, diâmetro médio de 5 µm, capeada e dimensão da coluna de 125 x 4,0 mm de d.i..

A estrutura para a FE Purospher Star[®] RP8e é semelhante a apresentada na Figura 13 para a FE LiChrosphere[®] 100 RP8e.

2.1.4. Placebos utilizados

Nas separações cromatográficas dos fármacos em medicamentos realizadas com a FE Si-C8-uréia foram usados placebos para avaliação da seletividade do método. Os placebos das formas farmacêuticas sólida (comprimido), semi-sólidas (creme e pomada) e líquidas (xarope, suspensão e solução) estão descritos a seguir:

Os comprimidos estudados apresentavam em suas composições os seguintes compostos: amido, celulose microcristalina, estearato de magnésio, dióxido de silício coloidal e talco. As cápsulas gelatinosas apresentavam como composição principal a gelatina e os demais excipientes usados estavam incluídos nos excipientes dos comprimidos. Os compostos presentes como excipientes no xarope e suspensão foram: sorbitol 70% m/v, açúcar líquido, metilparabeno, conservante e EDTA.

3. Métodos

3.1. Separação de furoato de mometasona em creme

A FE Si-C8-uréia foi aplicada na separação do composto furoato de mometasona, um corticóide sintético que age combatendo a inflamação e a coceira, cuja estrutura encontra-se na Figura 37. O medicamento é comercializado na forma farmacêutica de creme (1 mg/g de creme) e para esse estudo, um placebo contendo todos os excipientes presentes no creme foi preparado para avaliar as suas possíveis interferências, sendo os principais componentes do placebo: cera emulsificante não iônica, edetato dissódico diidratado, fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, petrolato branco, petrolato líquido, propilenoglicol e água deionizada.

Os compostos foram separados empregando colunas de 60 x 3,9 mm e de 125 x 3,9 mm, FM metanol:água 65:35 v/v a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹, para coluna de 60 mm e vazão de 1,0 mL min⁻¹ para coluna de 125 mm, temperatura de 25 °C, volume de injeção de 5 µL e detecção a 254 nm. A solução padrão foi preparada pela solubilização e diluição em FM para obtenção de uma solução de concentração de 0,03 mg/mL. A solução amostra foi preparada pela transferência de 1,5 gramas do creme para um tubo de plástico apropriado de 50 mL, adicionando 40 mL de etanol, aquecido a 50 °C para extração do

fármaco⁵, seguida de agitação por 15 minutos em vortex e transferência para balão volumétrico de 50 mL e diluição em FM.

Uma separação comparativa utilizando as mesmas condições cromatográficas, a vazão de 1,0 mL min⁻¹, foi realizada em uma coluna comercial Purospher Star[®] RP8 capeada e também em uma coluna de 60 x 3,9 mm recheada com a FE Lichrosorb[®] 60 Seletc B Merck.

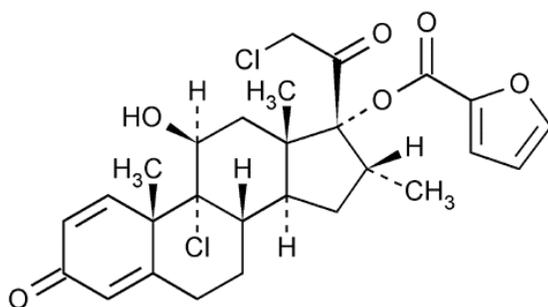


Figura 37: Estrutura química do furoato de mometasona.

3.2. Separação da mistura de clonazepam e compostos relacionados

O clonazepam é um benzodiazepínico, utilizado no tratamento de ansiedade e depressão, muito suscetível à decomposição, sendo que os seus principais produtos de decomposição são os compostos relacionados A (3-amino-4-(2-clorofenil)-6-nitrocarbostiril) e B (2-amino-2-cloro-5-nitrobenzofenona)⁵. O método desenvolvido para a separação de uma mistura constituída do fármaco clonazepam e compostos relacionados, Figura 38, utilizou uma coluna de 125 x 3,9 mm, recheada com a FE Si-C8-uréia, FM ACN:H₂O 60:40 v/v; vazão: 0,8 mL/min⁻¹; volume de injeção: 5 µL; detecção UV a 254 nm e temperatura de 25 °C.

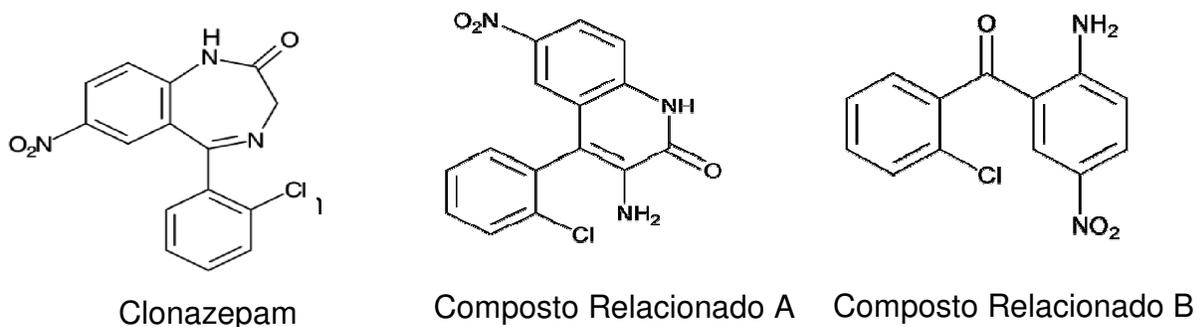


Figura 38 - Estrutura química do fármaco clonazepam e compostos relacionados A e B.

As amostras e os padrões foram preparados usando a FM como diluente, seguida de agitação por 15 minutos, para obter uma solução na concentração de 0,1 mg mL⁻¹.

Para avaliação do método desenvolvido, foi realizada a separação dos compostos usando as condições cromatográficas do método descrito na Farmacopéia Americana⁵, USP 32, FM metanol:tetraidrofurano:tampão fosfato de amônio pH 8,0 52:13:60 (v/v/v) a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 5 µL; detecção UV a 254 nm e temperatura: 25 °C. Uma separação comparativa utilizando as mesmas condições cromatográficas, vazão de 1,0 mL min⁻¹, foi realizada utilizando uma coluna comercial Purospher Star[®] RP8e capeada e também em uma coluna LiChrosorb[®] 100 RP8 não capeada, de dimensões de 125 x 4,0 mm.

3.3. Separação da mistura de alquilparabenos

Uma mistura de conservantes composta por uma série de quatro compostos parabênicos, metil- (23,0 mg L⁻¹), etil- (25,0 mg L⁻¹), propil- (28,0 mg L⁻¹) e butil-parabeno (20,0 mg L⁻¹), Figura 39, foi usada na avaliação da FE Si-C8-uréia. A mistura foi obtida a partir da solubilização dos compostos na FM. Os compostos foram separados empregando colunas de 125 mm x 3,9 mm e de 60 x 3,9 mm, recheadas com a FE Si-C8-uréia, FM acetonitrila:água (50:50 v/v) a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹ para coluna de 60 mm e 0,8 mL min⁻¹ para coluna 125 mm, temperatura de 25 °C, volume de injeção de 5 µL e detecção a 254 nm. As separações também foram realizadas em FE comerciais Purospher Star[®] RP8e capeada e coluna Lichrosorb[®] 100 RP8 não capeada, de dimensões de 125 x 4,0 mm.

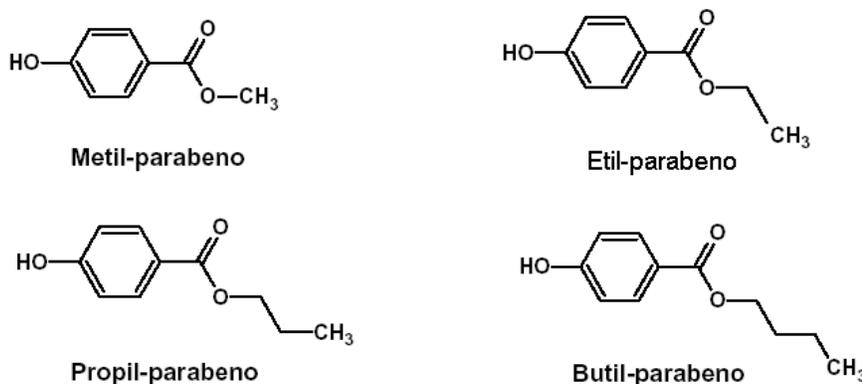


Figura 39 - Estrutura química dos alquilparabenos.

3.4. Separação da mistura de paracetamol, cafeína e ácido acetilsalicílico

O fármaco de caráter ácido, ácido acetilsalicílico (15 mg L^{-1}), e outros dois fracamente básicos, paracetamol (25 mg L^{-1}) e cafeína (25 mg L^{-1}), Figura 40, foram separados empregando uma coluna de $125 \text{ mm} \times 3,9 \text{ mm}$ recheada com a FE Si-C8-uréia, FM metanol:água pH 2,5 30:70 v/v, a uma vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, volume de injeção de $5 \text{ }\mu\text{L}$ e detecção a 254 nm . A mistura com os padrões dos compostos foi obtida a partir da solubilização dos mesmos na FM.

Uma separação comparativa utilizando as mesmas condições cromatográficas foi realizada em uma coluna comercial Purospher Star[®] RP8e capeada de $125 \text{ mm} \times 4,0 \text{ mm}$.

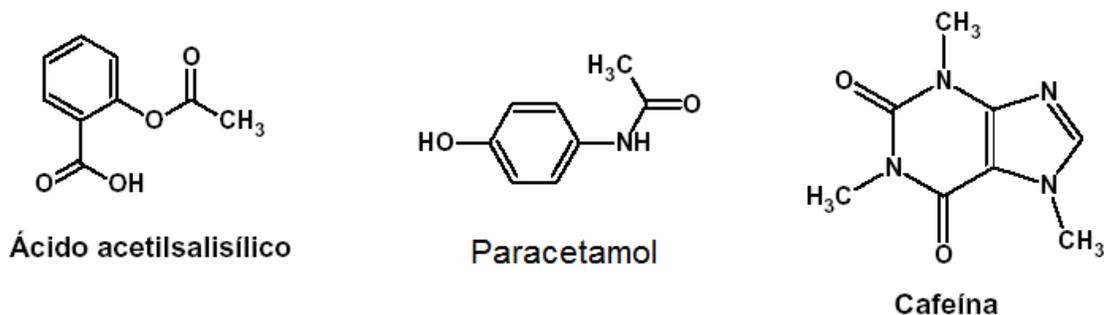


Figura 40 - Estrutura química do ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína.

3.5. Separação da dropropizina em xarope

O fármaco dropropizina, 3-(4-fenil-1-piperazinil)1,2-propandiol, agente antitussígeno, usualmente utilizado em xaropes na concentração de 3 mg/mL , Figura 41, foi separado dos demais constituintes do xarope utilizando a nova FE preparada. O xarope de dropropizina apresentava os seguintes constituintes: açúcar granulado, sorbitol, ácido benzóico, benzoato de sódio, álcool etílico 96° GL, corante amarelo F.D.C. nº 6, essência de laranja, ácido cítrico, glicerol e água purificada.

A solução padrão e a amostra foram preparadas a partir da solubilização e diluição em FM para obtenção de uma concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. A solução amostra foi agitada por 30 minutos, em agitador mecânico, para assegurar a homogeneidade da solução, seguida da diluição em FM.

Na separação foi utilizada uma coluna de $125 \times 3,9 \text{ mm}$, recheada com FE Si-C8-uréia, FM contendo uma mistura de tampão pH 3,0 ajustado com TEA e metanol na

proporção de 95:5 v/v, a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, temperatura de 30 °C, volume de injeção de 5 µL e detecção a 254 nm.

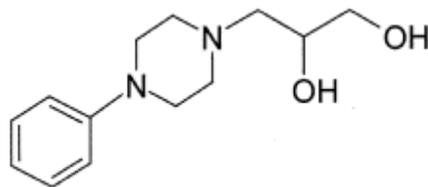


Figura 41 - Estrutura química da dropropizina.

3.6. Separação de clortalidona em comprimidos

A FE C8-uréia foi aplicada na separação de clortalidona (20,0 mg L⁻¹) em comprimidos. A clortalidona é um diurético utilizado principalmente no tratamento de hipertensão arterial e insuficiência cardíaca congestiva. O fármaco clortalidona, Figura 42, foi separado empregando uma coluna de 125 mm x 3,9 mm recheada com a FE Si-C8-uréia, FM metanol:água 35:65 v/v, a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, temperatura de 25 °C, volume de injeção de 5 µL e detecção a 220 nm. A partir do placebo contendo os excipientes lactose, estearato de magnésio, talco, amido e corante, foi preparada uma solução para verificação dos interferentes na separação da clortalidona. A solução amostra foi preparada a partir da pesagem de 20 comprimidos, maceração em grau de porcelana com auxílio de pistilo até a obtenção de um pó fino e homogêneo, seguida da pesagem do equivalente a 40 mg de clortalidona. O material pesado foi transferido para balão volumétrico de 200 mL, adicionado cerca de 100 mL de FM e o balão agitado por 30 minutos. Após esse período, o volume do balão foi completado com a FM e uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, seguida da diluição com FM. A solução amostra apresentou a concentração de 20,0 mg L⁻¹.

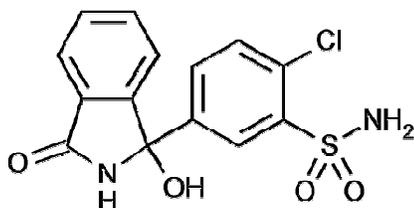


Figura 42 - Estrutura química da clortalidona.

3.7. Separação de uma mistura de cefalexina, prilocaína e amitriptilina

A aplicação da FE Si-C8-uréia foi avaliada na separação de uma mistura de compostos de características básicas: cefalexina (25 mg L^{-1}), prilocaína (15 mg L^{-1}) e amitriptilina (15 mg L^{-1}), Figura 43. Os fármacos foram escolhidos por apresentarem na estrutura química o grupamento amina, de característica básica, que pode facilitar a interação do composto com os grupos silanóis residuais da sílica, avaliando a aplicabilidade da nova FE preparada. Os compostos foram separados empregando colunas de dimensões de $125 \times 3,9 \text{ mm}$ e $60 \times 3,9 \text{ mm}$ recheadas com a FE Si-C8-uréia, FM metanol:água pH 7,0 65:35 v/v, a uma vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, volume de injeção de $5 \text{ } \mu\text{L}$ e detecção a 254 nm . A solução padrão foi preparada a partir da solubilização e diluição em FM para obtenção da concentração desejada de cada fármaco.

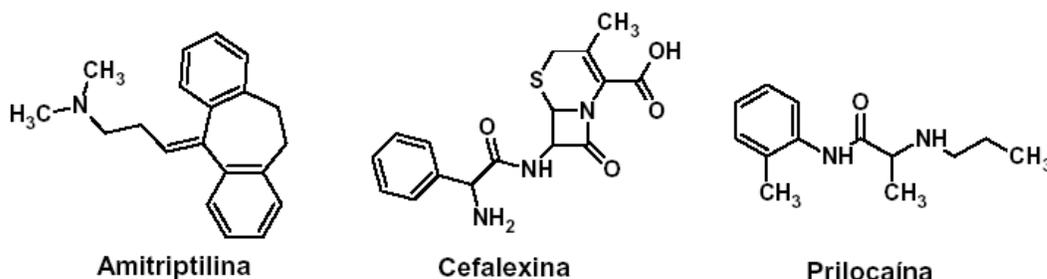


Figura 43 - Estrutura química da amitriptilina, cefalexina e prilocaína.

As separações também foram realizadas utilizando uma coluna comercial Purospher Star[®] RP8 capeada[®] e uma coluna Lichrosorb[®] 100 RP8 não capeada de dimensões de $125 \times 4,0 \text{ mm}$, com a mesma FM e vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

3.8. Separação de uma mistura de benzodiazepínicos

A FE Si-C8-uréia foi aplicada na separação de uma mistura de benzodiazepínicos, compostos de características básicas que podem ter interação com os grupos silanóis residuais da sílica. A amostra foi preparada a partir de uma mistura dos fármacos alprazolam (10 mg L^{-1}), clordiazepóxido ($15,0 \text{ mg L}^{-1}$), clonazepam (12 mg L^{-1}) e diazepam ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$), Figura 44, diluídas em FM. Para separação empregaram-se colunas de $125 \times 3,9 \text{ mm}$ e de $60 \times 3,9 \text{ mm}$, recheadas com a FE Si-C8-uréia, FM acetonitrila:água 40:60

v/v, a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹, temperatura de 25 °C, volume de injeção de 5 µL e detecção a 254 nm.

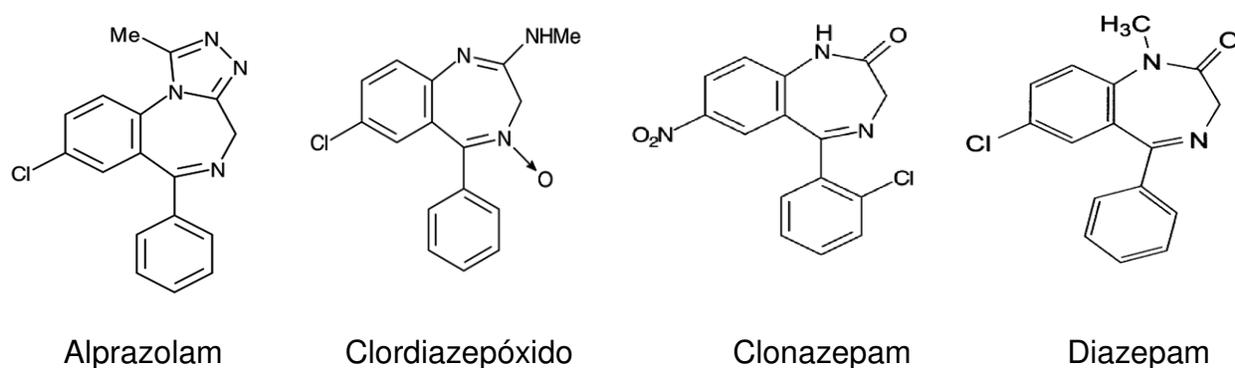


Figura 44 - Estrutura química dos benzodiazepínicos.

4. Resultados e discussão

4.1. Separação de furoato de mometasona em creme

A FE Si-C8-uréia foi usada na separação de furoato de mometasona, potente antiinflamatório glicocorticoíde¹⁰³, presente em creme e comparada com uma coluna comercial contendo FE C8. A FE Si-C8-uréia separou o composto ativo dos demais excipientes contidos no creme com picos simétricos, boa resolução e eficiência, conforme pode ser visualizada nos cromatogramas da Figura 45.

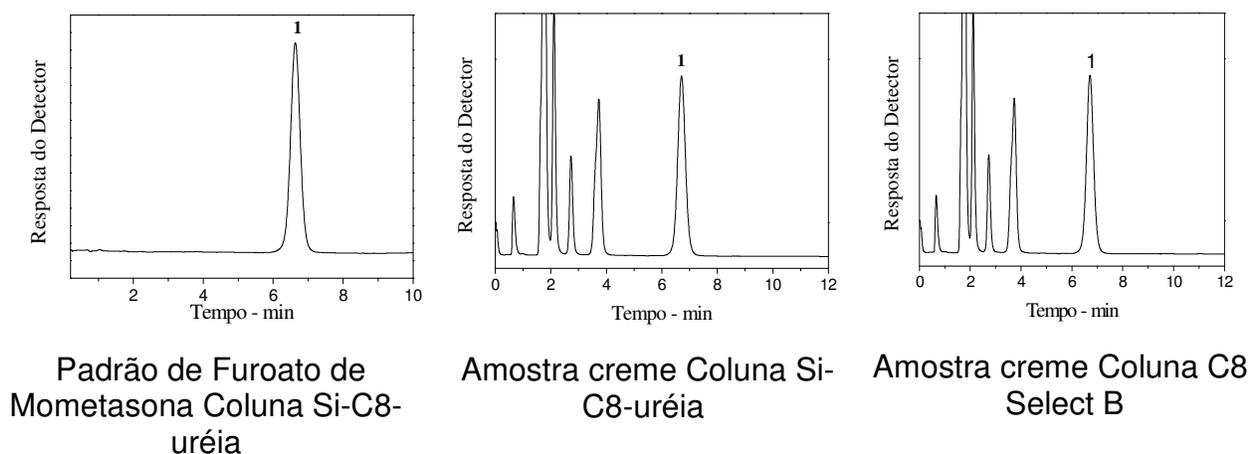


Figura 45 – Cromatogramas obtidos na separação de furoato de mometasona nas colunas Si-C8-uréia 60 x 4,0 mm e coluna Select B 60 x 4,0 mm; Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; FM MeOH: H₂O (65:35 v/v); vazão: 0,6 mL min⁻¹; detecção UV a 254 nm e temperatura: 25 °C Composto 1 – furoato de mometasona.

A separação obtida com a coluna recheada com a FE Si-C8-uréia foi bastante similar em relação ao tempo de retenção, eficiência, simetria e resolução quando comparada com a separação obtida com a coluna C8 comercial Lichrosorb® 60 Select B.

A Tabela 17 apresenta a média dos valores obtidos para os parâmetros cromatográficos na separação de furoato de mometasona usando a FE Si-C8-uréia.

Tabela 17 – Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de furoato de mometasona.

Coluna	Furoato Mometasona Padrão			Furoato Mometasona Creme		
	k	N/m (m ⁻¹)	A _S	k	N/m (m ⁻¹)	A _S
Lichrosorb Select B 60 x 4,0 mm	6,5	44950	1,0	6,5	45300	1,0
Si-C8-uréia 60 x 4,0 mm	7,3	41717	0,9	7,2	45733	0,9

As condições aqui propostas com a coluna de 60 x 3,9 mm recheada com a FE Si-C8-uréia podem ser aplicadas na separação tanto em matéria-prima quanto em produto acabado e mostrou resultados semelhantes aos obtidos pelo método da Farmacopéia Americana⁵. A separação obtida com a FE Si-C8-uréia mostrou bons resultados para os parâmetros cromatográficos, similares aos obtidos em outras separações disponíveis na literatura. Teng *et al.*¹⁰³ obtiveram separação satisfatória do furoato de mometasona e seus produtos de degradação em formulações farmacêuticas e fluídos biológicos, usando coluna recheada com FE C8 (Ultraspher Octil) e FM contendo MeOH:H₂O 59:41, v/v com detecção UV a 248 nm. Shaikh *et al.*¹⁰⁴ realizaram a separação simultânea de furoato de mometasona, clorocresol e ácido fusídico em formulações farmacêuticas de creme, utilizando coluna recheada com FE C8 (Symmetry C8) e FM ACN:tampão acetato de amônio 45:55 v/v, com detecção UV a 240 nm, obtendo boa resolução e picos simétricos.

4.2. Separação da mistura de clonazepam e compostos relacionados

O método atualmente descrito na Farmacopéia Americana⁵ para determinação do clonazepam e os compostos relacionados sugere o uso de FM tamponada em mistura com metanol e tetraidrofurano. Para verificar a aplicabilidade da FE Si-C8-uréia foi desenvolvido um novo método de análise com FM sem tampão, usando apenas o

modificador orgânico. Uma comparação entre a FE Si-C8-uréia com outras colunas C8 foi realizada para avaliar a capacidade de separação da nova FE preparada. A Figura 46 apresenta os cromatogramas das separações obtidas com a coluna Si-C8-uréia e com as colunas comerciais recheadas com as FE Lichrosorb® 100 RP8e (C8e) e Lichrosorb® 100 RP8 (C8ne) e na Tabela 18 estão os parâmetros cromatográficos.

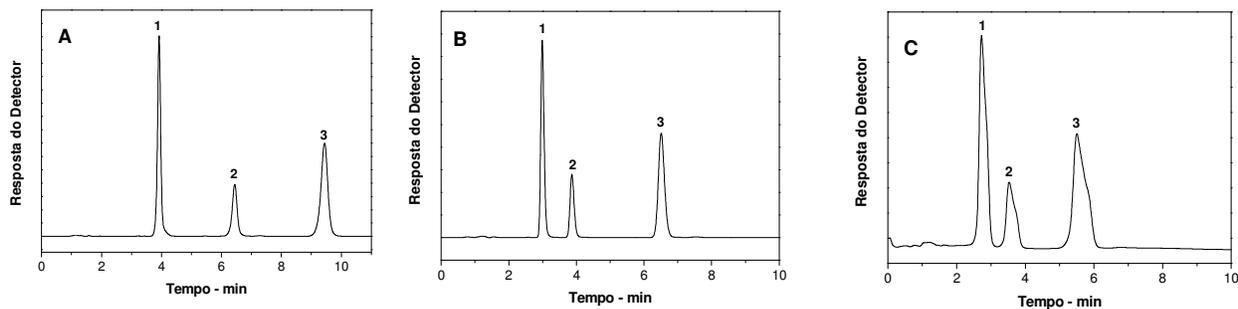


Figura 46 – Cromatogramas obtidos na separação de clonazepam (1) e compostos relacionados A (2) e B (3). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; colunas Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm (A), C8e 125 x 4,0 mm (B), C8ne 125 x 4,0 mm (C); FM ACN:H₂O 60:40; vazão: 0,8 mL min⁻¹; detecção UV a 254 nm e temperatura: 25 °C.

Tabela 18 – Parâmetros cromatográficos obtidos na separação do clonazepam e compostos relacionados.

Coluna	Compostos										
	Clonazepam			Composto Relacionado A				Composto Relacionado B			
	t _R (min)	N/m (m ⁻¹)	As	t _R (min)	N/m (m ⁻¹)	As	R _S ^a	t _R (min)	N/m (m ⁻¹)	As	R _S ^b
Si-C8-uréia	3,9	52080	1,0	6,5	59176	1,0	10,2	9,4	65416	0,9	8,3
C8e*	3,0	34432	1,2	3,9	38440	1,2	4,3	6,5	47240	1,5	9,4
C8ne*	2,7	5360	1,3	3,5	5816	1,3	1,7	5,5	6744	2,2	3,1

a – resolução em relação ao pico do clonazepam e o composto relacionado A; b – resolução em relação ao composto relacionado B e composto relacionado A. * Coluna comercial.

A Farmacopéia Americana⁵ sugere o valor de resolução acima de 2,0 entre os compostos relacionados e fator de assimetria menor que 1,5. Os valores obtidos nas colunas recheadas com a FE Si-C8-uréia e Lichrosorb® 100 RP8e (C8e) estão de acordo com esta especificação.

Para avaliar a eficácia do método desenvolvido empregando a FE Si-C8-uréia e FM ACN:H₂O 60:40 v/v foi feita a comparação com o método descrito na Farmacopéia

Americana⁵, utilizando uma coluna comercial Lichrosorb[®] 100 RP8e capeada. O método descrito pela USP utiliza FM composta por metanol, tetraidrofurano e tampão fosfato. A Figura 47 apresenta o cromatograma da separação cromatográfica obtida com a coluna comercial C8. Pode-se observar que apesar de utilizar uma vazão maior, 1,0 mL min⁻¹, a separação ocorreu em tempos de retenção maiores, o que mostra a superioridade da FE Si-C8-uréia. O método desenvolvido apresentou eficiência de separação similar ao método farmacopéico, com a vantagem de não usar tampão na composição da FM.

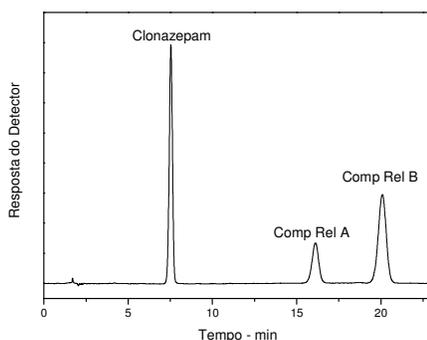


Figura 47 – Cromatograma obtido na separação de clonazepam e compostos relacionados. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna RP8e 125 x 4,0 mm; FM: metanol:tetraidrofurano:tampão fosfato de amônio pH 8,0 52:13:60 (v/v/v); vazão 1,0 mL min⁻¹; detecção UV a 254 nm e temperatura 25 °C.

4.3. Separação da mistura de alquilparabenos

A separação de fármacos com características apolares também foi avaliada na FE Si-C8-uréia. Uma mistura de alquilparabenos, conservantes comumente encontrados em formulações farmacêuticas, foi utilizada para comparar a separação em colunas recheadas com a nova FE Si-C8-uréia e colunas comerciais C8 capeada e C8 não capeada. Os cromatogramas obtidos na separação estão apresentados na Figura 48.

As FE Si-C8-uréia e C8e apresentaram boa separação com resolução adequada e picos simétricos para os quatro compostos (A_s 1,0 a 1,2), com tempos de análise inferiores a 6 minutos na FE C8e e a 9 minutos na FE Si-C8-uréia. A separação desses compostos na FE Si-C8-uréia usando uma FM acetonitrila:água mostrou a boa seletividade da coluna. A separação obtida com a fase RP8 não capeada apresentou picos com caudas para os quatro compostos ($A_s > 1,5$) e baixa resolução comparada aos valores obtidos com a FE Si-C8-uréia.

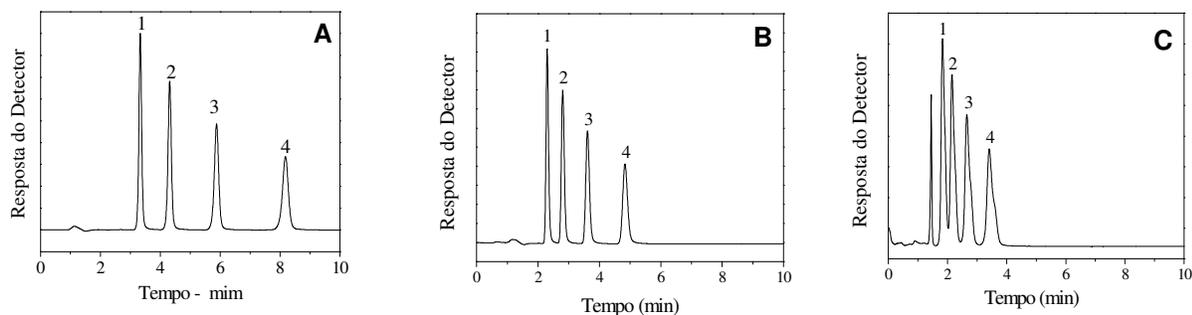


Figura 48 – Cromatogramas obtidos na separação de alquilparabenos. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm (A), C8e 125 x 4,0 mm (B); C8ne 125 x 4,0 mm (C); FM: ACN:H₂O 50:50 v/v; vazão: 0,8 mL/min; detecção UV a 254 nm e temperatura: 25 °C, Compostos: 1-metil, 2-etil, 3-propil e 4-butilparabeno.

A não proteção do silanol residual provavelmente influenciou na separação, com eficiência reduzida e picos assimétricos obtida com a FE C8 não capeada. O pico que elui antes do metil parabeno no cromatograma da Figura 48C é devido a um contaminante da análise. A Tabela 19 apresenta um resumo dos parâmetros cromatográficos obtidos na separação de alquilparabenos com a FE Si-C8-uréia.

Tabela 19 – Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de alquilparabenos.

Coluna	Composto	t _R (min)	A _S 10%	N/m	R _S
Coluna C8-uréia 125 x 3,9 mm	Metilparabeno	3,4	1,0	48852	----
	Etilparabeno	4,4	1,0	54016	5,2
	Propilparabeno	5,8	1,0	58796	6,5
	Butilparabeno	8,4	1,0	62720	7,2
Coluna RP8e 125 x 4,0 mm	Metilparabeno	2,3	1,2	29712	----
	Etilparabeno	2,8	1,2	31192	3,1
	Propilparabeno	3,6	1,2	32872	4,0
	Butilparabeno	4,8	1,2	33896	4,7
Coluna RP8 ne 125 x 4,0 mm	Metilparabeno	1,8	----	7416	----
	Etilparabeno	2,2	----	9120	1,3
	Propilparabeno	2,7	1,4	10672	1,9
	Butilparabeno	3,4	1,4	11808	2,4

As Farmacopéias Americana⁵, Brasileira⁶⁶ e Britânica⁵⁵ preconizam a titulação potenciométrica para quantificação dos parabens em matérias-primas, entretanto, não estabelecem metodologia para quantificação de parabens em preparações farmacêuticas. A metodologia farmacopéica para análise de parabens em matéria-prima envolve várias etapas, tornando o procedimento analítico demorado e de difícil automação, além de ser

incapaz de distinguir um parabenos do outro. Oliveira e Lima¹⁰⁵ realizaram a separação de parabenos em cápsula gelatinosa e dura, obtendo resultados satisfatórios de resolução e de fator de assimetria. Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: coluna Microsorb® C8 250 x 4,6 mm, 5 µm, FM metanol e solução de ácido acético a 1% em água, eluição por gradiente, vazão de 1,0 mL/min, detecção UV a 254 nm. A separação com a FE Si-C8-uréia foi realizada em menor tempo e com desempenho semelhante ao obtido por Oliveira e Lima¹⁰⁵.

4.4. Separação da mistura de paracetamol, cafeína e ácido acetilsalicílico

A separação da mistura de fármacos contendo um composto ácido, ácido acetilsalicílico (AAS) e dois compostos fracamente básicos, paracetamol e cafeína, foi avaliada na FE Si-C8-uréia e comparada à separação obtida em uma fase comercial com grupo C8 ligado à sílica, da Merck. As duas fases apresentaram boa separação para os compostos, com eluições relativamente rápidas, como mostrado nos cromatogramas da Figura 49.

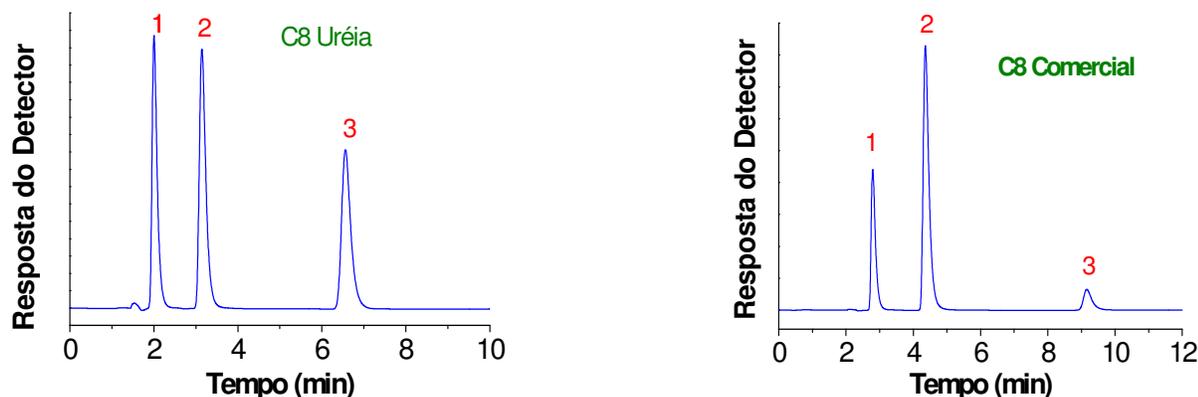


Figura 49 – Cromatogramas obtidos na separação de paracetamol (1), cafeína (2) e AAS (3). Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; FM MeOH: H₂O pH 2,5 30:70 (v/v), vazão: 0,8 mL min⁻¹; detecção UV a 254 nm e temperatura de 25 °C.

A mistura de fármacos foi escolhida devido às características dos compostos e por serem constituintes de medicamentos disponíveis em drogarias, por exemplo os Bisolgrip T[®] e Cibalena[®], empregados no tratamento de quadros dolorosos, como cefaléia, enxaquecas, dismenorréia, dores nevriticas e reumáticas, quadros inflamatórios, febre e

também nas constipações¹⁰⁶. Faria¹⁴ avaliou a separação desta mistura de fármacos utilizando FE Si-Ti(PMTDS) imobilizada termicamente e comparou com a separação obtida em uma fase comercial com grupo C8 quimicamente ligado à sílica. As fases apresentaram boa separação para os compostos, com eluições relativamente rápidas. Entretanto, a ordem de eluição foi diferente, devido à maior hidrofobicidade da FE Si-Ti(PMTDS), na qual o ácido acetilsalicílico foi o primeiro composto a ser eluído, enquanto que na fase comercial este composto foi o último a ser eluído, e, mesmo assim, sendo necessária a utilização de uma FM em pH 2,5 para acelerar sua eluição. Rosa *et al.*¹⁰⁷ compararam esta separação obtida na FE Si-C8-uréia e na FE C8 comercial, obtendo separações semelhantes.

4.5. Separação de dropropizina em xarope

O fármaco dropropizina é um agente antitussígeno com atividade anti-histamínica¹⁰⁸, presente em formulações de xarope contendo concentrações elevadas de açúcar, conhecidas como, por exemplo, Vibral®, Dropropizina genérico. O fármaco foi separado utilizando a coluna recheada com a FE Si-C8-uréia com fator de assimetria de 1,07 e eficiência de 104472 N m^{-1} . O cromatograma da separação da dropropizina está apresentado na Figura 50.

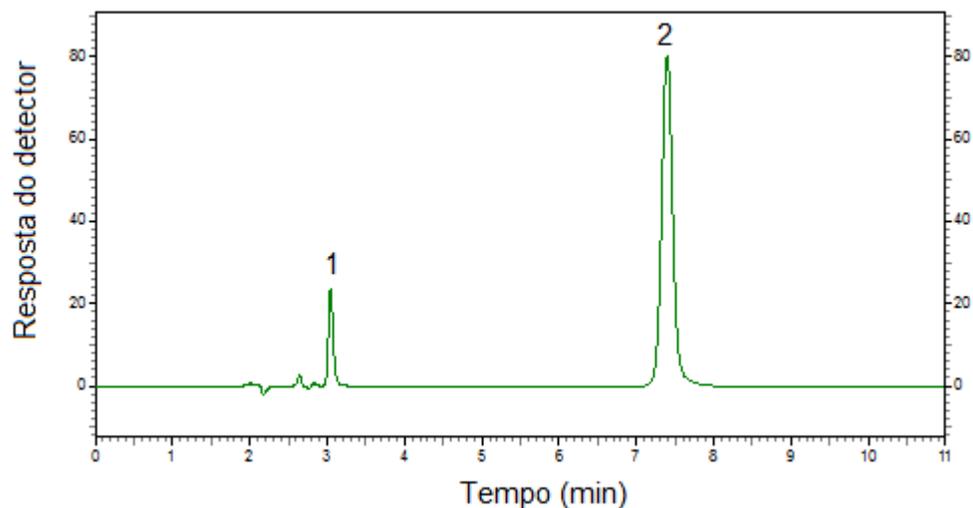


Figura 50 – Cromatograma obtido na separação de dropropizina em xarope. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 μL ; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM: tampão pH 3,0 (TEA 0,05%):metanol (95/5 v/v), vazão 1,0 mL/min; detecção UV a 240 nm e temperatura de 30 °C. Compostos: (1) excipiente e (2) dropropizina.

Os resultados obtidos foram semelhantes ao método descrito na Farmacopéia Americana⁵ que faz uso de coluna C18 e FM tamponada com ácido fosfórico em pH 3,0 e par iônico heptanossulfônico e acetonitrila. O método desenvolvido não faz uso do reagente par iônico na FM e utiliza como FM uma mistura de tampão de TEA e metanol, que resultou em bom desempenho cromatográfico. Estas condições propiciam um maior tempo de vida para a coluna cromatográfica sendo possível a utilização em várias análises.

Abdallah¹⁰⁹ realizou a determinação espectrofotométrica de dropropizina e guaifenesina utilizando o método de oxidação seguido de condensação. Entretanto, este método permite apenas a quantificação dos fármacos, pois possíveis impurezas análogas aos compostos reagem da mesma forma que os ativos, não sendo possível a sua determinação. Desta forma, o método espectrofotométrico não apresenta seletividade satisfatória. Tang *et al.*¹¹⁰ obtiveram boa separação da levodropropizina utilizando zolmitriptana como padrão interno em plasma humano com detecção por espectrometria de massas, FE Nucleosil C18 e FM contendo acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ (1% ácido fórmico v/v) e metanol 55:45, v/v.

4.6. Separação de clortalidona em comprimidos

O fármaco clortalidona, diurético tiazídico, apresenta ação diurética e anti hipertensiva que age nos rins levando a excreção de água e potássio¹⁰⁸. O fármaco está presente em formulações sólidas como Higroton®, genéricos e em comprimidos similares de clortalidona. A Figura 51 apresenta o cromatograma da separação da clortalidona.

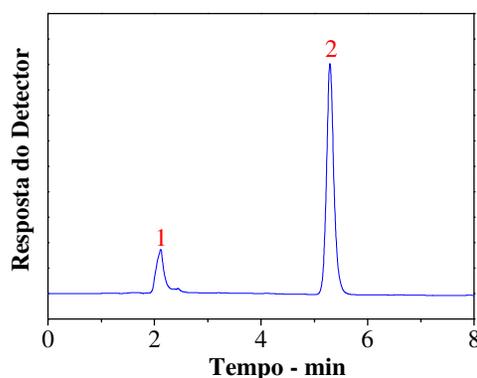


Figura 51 – Cromatograma obtido na separação de clortalidona em comprimidos. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM: metanol:H₂O (H₃PO₄) pH 3,0 (35:65 v/v), vazão 1,0 mL/min, detecção UV a 220 nm e temperatura 25 °C. Compostos: 1 – excipiente, 2 – clortalidona.

O método desenvolvido utilizando a FE Si-C8-uréia e FM metanol:água pH 3,0 (H₃PO₄) 35:65 v/v separou muito bem a clortalidona dos excipientes presentes no comprimido, com picos simétricos, boa resolução e eficiência confirmadas no cromatograma da Figura 51.

A Figura 52 apresenta o cromatograma em três dimensões (3D) da clortalidona, no qual é possível visualizar que não há interferentes que coeluem com o fármaco, que apresentou pureza de pico maior que 99,9%.

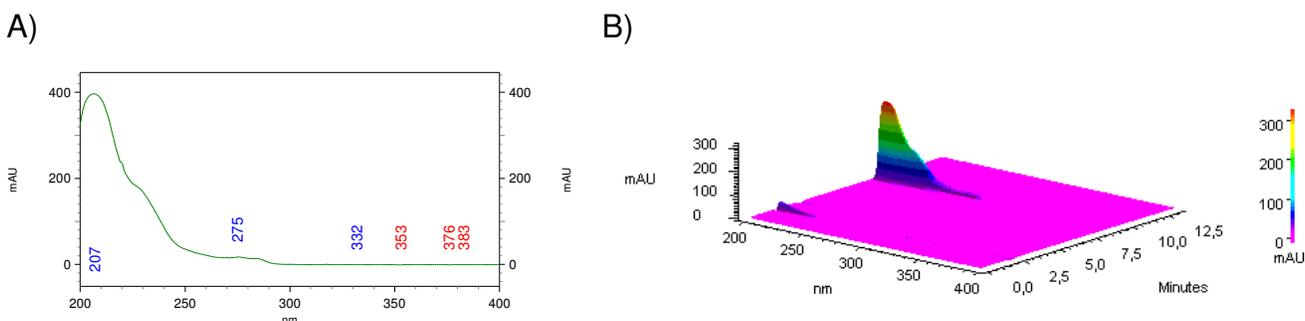


Figura 52 – Espectro de absorção no UV da clortalidona na condição cromatográfica ótima de separação em duas dimensões A) e B) cromatograma em 3D.

El-Gindy e Mostafa¹¹¹ realizaram a separação simultânea de atenolol, cloridrato de amilorida e clortalidona utilizando uma coluna recheada com FE C18 e FM acetonitrila e reagente par iônico heptanossulfonato de sódio, 5 mmol L⁻¹ pH 4,0. Eles obtiveram boa resolução e fator de assimetria entre os picos dos fármacos. Elshanawane *et al.*¹¹² desenvolveram e validaram um método para determinação simultânea de atenolol, cloridrato de amilorida, hidroclorotiazida e clortalidona usando FE cianopropil e FM constituída de metanol e tampão fosfato de potássio pH 4,5 75:25 v/v, obtendo parâmetros de separação aceitáveis para todos os compostos. O método desenvolvido utilizando a FE Si-C8-uréia preparada não empregou FM contendo tampão como os métodos descritos na literatura e apresentou separação semelhante às descritas nestes métodos.

4.7. Separação de uma mistura de cefalexina, prilocaína e amitriptilina

A FE Si-C8-uréia foi usada na separação da mistura de cefalexina, prilocaína e amitriptilina e comparada com uma coluna comercial contendo FE C8 capeada e não capeada. A FE Si-C8-uréia separou muito bem os três fármacos, com picos simétricos, boa

resolução e eficiência conforme pode ser visualizada nos cromatogramas da Figura 53, na qual é mostrado também o cromatograma obtido na separação da mistura com a fase C8 comercial capeada e não capeada. Nesta colunas, os compostos cefalexina e prilocaína foram separados de forma semelhante à FE Si-C8-uréia, entretanto, a separação da amitriptilina foi obtida com elevado tempo de retenção e com pico assimétrico, devido à interação do composto básico com o silanol residual da sílica, principalmente na FE comercial não capeada.

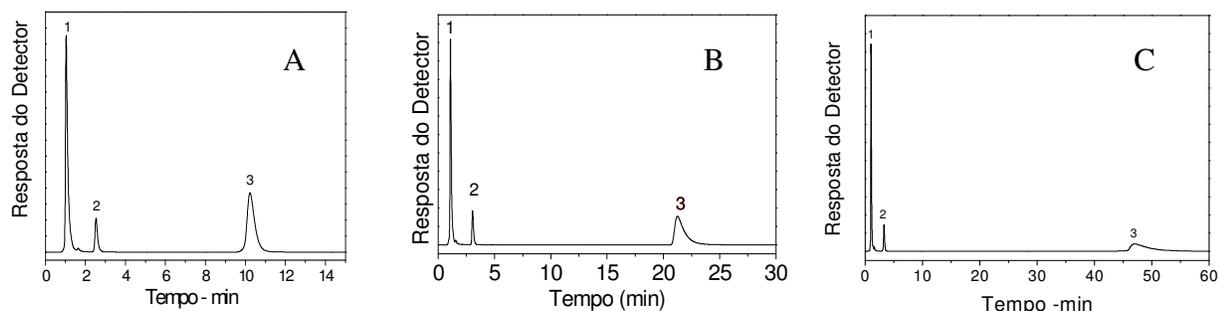


Figura 53 – Cromatogramas obtidos na separação de cefalexina (1), prilocaína (2) e amitriptilina (3). Condições cromatográficas: colunas A) FE Si-C8-uréia, B) C8e e C) C8ne; volume de injeção 5 μ L; FM: MeOH:H₂O pH 7,0 (65:35, v/v), vazão: 1,0 mL min⁻¹; detecção UV a 254 nm e temperatura de 25 °C.

Na separação obtida com a FE C8 comercial não capeada o efeito da interação da amitriptilina com o silanol residual da sílica foi muito maior, uma vez que o seu fator de assimetria foi de 2,7 contra 1,4 obtido com a FE Si-C8-uréia, além de ter apresentado um tempo de retenção próximo a 50 minutos. Faria¹⁴ avaliou a separação desta mistura de fármacos utilizando FE Si-Ti(PMTDS) imobilizada termicamente empregando uma FM tamponada em pH 12, MeOH:tampão 20 mmol L⁻¹ K₂HPO₄ pH 12 (80:20, v/v), para evitar a contribuição dos grupos silanóis residuais no mecanismo de separação, pois os silanóis residuais e os fármacos estão em suas formas desprotonadas. Para comparação, foi realizada a separação usando FE C8 comercial com uma FM pH 7, MeOH:H₂O pH 7,0 (65:35, v/v), para evitar a dissolução da sílica, obtendo pico com cauda acentuada para o composto amitriptilina.

A eficiência de separação obtida com a FE Si-C8-uréia foi maior comparada às demais fases avaliadas. Os parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura de cefalexina, prilocaína e amitriptilina encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20 - Parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura de cefalexina, prilocaína e amitriptilina.

Compostos	Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm			C8e comercial 125 x 4,0 mm			C8ne comercial 125 x 4,0 mm		
	t _R (min)	N/m	A _S	t _R (min)	N/m	A _S	t _R (min)	N/m	A _S
Cefalexina	1,0	4320	1,7	1,1	3944	1,8	1,0	3592	1,7
Prilocaína	2,5	16992	1,4	3,1	18952	1,4	3,3	14216	1,1
Amitriptilina	10,2	29120	1,4	21,2	21593	2,5	47,0	9878	2,7

4.8. Mistura de benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos são compostos em sua maioria de caráter básico e apresentam valores altos de pKa, podendo ocorrer interações com os silanóis residuais da sílica.

A separação da mistura de benzodiazepínicos foi realizada com o intuito de avaliar a eficiência da FE na separação de compostos de natureza básica e, desta forma, avaliar também a atividade silanfílica da FE pela interação dos grupos silanóis residuais com os compostos de caráter básicos.

A separação obtida com a coluna de 125 x 3,9 mm recheada com a FE Si-C8-uréia apresentou picos bem definidos e simétricos, boa eficiência e resolução, como pode ser visto na Figura 54.

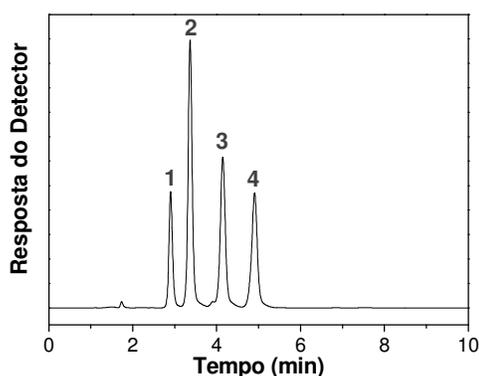


Figura 54 – Cromatograma obtido na separação de benzodiazepínicos. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM acetonitrila:água (40/60 v/v); vazão 0,6 mL/min, detecção UV a 254 nm e temperatura 25 °C. Compostos: (1) alprazolam, (2) clordiazepóxido, (3) clonazepam e (4) diazepam.

O método apresenta possível aplicação na separação de benzodiazepínicos em amostras de água de lavagem de reator utilizado na produção do medicamento, no processo de limpeza e de validação dos reatores de produção, na água de enxágue e na avaliação de medicamentos.

A Tabela 21 apresenta os parâmetros cromatográficos obtidos na separação dos benzodiazepínicos na FE Si-C8-uréia. A resolução obtida entre os compostos alprazolam e clordiazepóxido foi de 2,8, o que comprova a boa seletividade da FE Si-C8-uréia. O valor de assimetria de 1,1 para ambos os compostos comprovam que a FE Si-C8-uréia apresenta reduzida atividade silanofílica.

Tabela 21 – Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de benzodiazepínicos usando FE Si-C8-uréia.

Compostos	Parâmetros Cromatográficos			
	t_R (min)	A_S	$N\ m^{-1}$	R_S
Alprazolam	2,9	1,1	43776	-----
Clordiazepóxido	3,4	1,1	47896	2,8
Clonazepam	4,1	1,0	48408	4,0
Diazepam	4,9	1,0	52648	3,3

Uddin *et al.*¹¹³ realizaram a validação do método para determinação de alprazolam, clonazepam e diazepam, entre outros benzodiazepínicos em amostras de urina, sangue e saliva, usando como técnica de preparo da amostra a extração em fase sólida e a separação em coluna Kromasil C8 e FM consistindo de um gradiente contendo MeOH, ACN e tampão acetato de amônio 0,05 mol L⁻¹. Os parâmetros cromatográficos obtidos na separação foram semelhantes aos da separação usando a FE Si-C8-uréia.

5. Conclusão

A FE Si-C8-uréia mostrou-se seletiva na separação dos fármacos avaliados, presentes em diferentes matrizes farmacêuticas, como, comprimidos, xaropes e cremes. Em alguns métodos desenvolvidos não foram utilizados tampões na FM, sendo uma vantagem frente aos métodos descritos nas farmacopéias e na literatura, que empregam quantidades significativas de sais para o preparo da FM. Alguns dos métodos desenvolvidos possibilitaram separações mais rápidas, com uso de FM com maior

composição aquosa quando comparada com métodos da Farmacopéia Americana. Os parâmetros cromatográficos obtidos na separação dos fármacos utilizando a FE Si-C8-uréia foram semelhantes, ou, muitas vezes, melhores que os conseguidos com colunas C8 comerciais, e também em comparação com as separações destes fármacos descritas na literatura empregando FE C18, cianopropil ou de sílica titanizada. Nas separações empregando os compostos básicos foram obtidos picos mais simétricos, com menor tempo de retenção e melhor eficiência, comprovando a baixa atividade silanofílica da FE, provavelmente atribuída ao grupo polar uréia e ao processo de capeamento, a que a FE foi submetida. Os métodos desenvolvidos mostraram potencialidade na determinação quantitativa de fármacos em medicamentos e a nova FE FE Si-C8-uréia demonstrou eficiência na separação de diversos fármacos, comprovando o bom desempenho e a potencialidade de aplicação na análise de medicamentos.

Capítulo V

Desenvolvimento e Validação de Métodos para Determinação de Fármacos

1. Introdução

1.1. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos

Para avaliar a aplicação da FE Si-C8-uréia foi realizado o desenvolvimento e validação de métodos para quantificação de antiinflamatórios e fungicidas em cremes, cloxazolam e impurezas em comprimidos, cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina em xarope, alprazolam em comprimidos e mistura de estatinas em cápsulas. As figuras de mérito avaliadas foram: seletividade, limite de detecção e de quantificação, linearidade, precisão, recuperação (exatidão), robustez e estabilidade.

1.2. Estudo dos produtos de degradação

O estudo de produtos de degradação foi realizado para verificar se o método desenvolvido para determinação do fármaco é capaz de separar os compostos provenientes de diferentes fontes de degradação do composto, quando o medicamento fica exposto, por exemplo, a luz, a temperatura ou a umidade. O estudo de degradação foi realizado utilizando as seguintes condições: ácida, básica, oxidativa, temperatura e luz. Nesse estudo, foi empregada a coluna recheada com a FE Si-C8-uréia.

2. Parte Experimental

2.1. Materiais

2.1.1. Equipamentos

- ✚ Cromatógrafo a líquido, Shimadzu, composto de uma bomba de alta pressão tipo pistão duplo, Shimadzu modelo LC-10 AD; detector espectrofotométrico de absorção no UV-Vis de comprimento de onda variável, Shimadzu modelo SPD-10 AV; válvula de injeção (alça de amostragem 5 µL), Rheodyne modelo 8125; Softwares usados para aquisição de dados – Chrom Perfect for Windows 3.52.
- ✚ Cromatógrafo a líquido, Merck-Hitachi Elite, composto de uma bomba de alta pressão de quatro canais L-7130, forno Merck-Hitachi L-2300, injetor automático Merck-Hitachi L-2200, detector por arranjo de diodo Merck-Hitachi L-2450 e software EZChrom .
- ✚ Cromatógrafo a líquido-DAD-MS/MS Agilent 1200, Ion Trap 6330, composto de uma bomba de alta pressão de quatro canais, forno, injetor automático, detector por arranjo de diodo G-1315A, detector de massas Ion Trap G4533AA e software ChemStation.

2.1.2. Reagentes

- Acetonitrila, grau HPLC, Tedia.
- Ácido fosfórico 85% p.a., J.T.Baker.
- Água deionizada, Milli-Q plus.
- Alprazolam, doado pela Sintefina.
- Atorvastatina, doado pela Medley.
- Clioquinol, doado pela Medley.
- Cloridrato de Clobutinol, doado pela Medley.
- Cloxazolam, doado pela Sintefina.
- Fluvastatina, doado pela Medley.
- Fosfato de Potássio Monobásico p.a., Merck
- Lovastatina, doado pela Medley.
- Metanol, grau HPLC, Tedia.
- Pravastatina, doado pela Medley.
- Sinvastatina, doado pela Medley.
- Succinato de doxilamina, doado pela Medley.
- Tolnaftato, doado pela Medley.
- Tetraidrofurano, grau HPLC, Tedia.
- Valerato de Betametasona, doado pela Medley.

3. Métodos

3.1. Desenvolvimento e validação de método para separação da mistura de fármacos em creme com ação antiinflamatória e fungicida.

A separação de uma mistura de fármacos contidos em formulações de creme indicado para o alívio das manifestações inflamatórias das dermatoses foi utilizada para avaliar a FE Si-C8-uréia. A mistura era composta de valerato de betametasona (0,5 mg/g), fármaco antiinflamatório, antipruriginoso e vasoconstritor, de tolnaftato (10 mg/g) um agente fungicida e o agente antifúngico e antibacteriano, clioquinol (10 mg/g), cujas estruturas químicas estão na Figura 55.

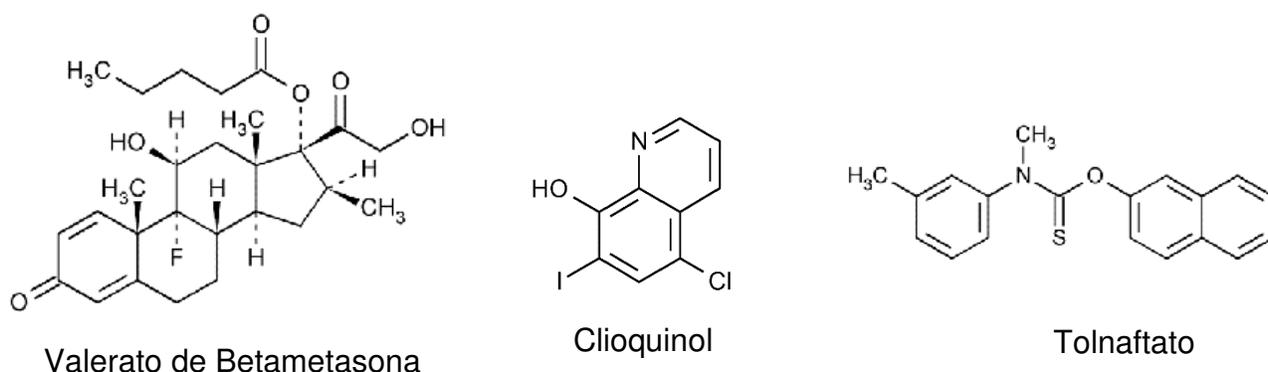


Figura 55 – Estruturas químicas do valerato de betametasona, clioquinol e tolnaftato.

No estudo, um placebo contendo todos os excipientes presentes no creme foi preparado para avaliar as suas possíveis interferências, sendo os principais componentes do placebo: clorocresol, éter cetílico de polioxietileno, álcool cetosteárico, petrolato branco, petrolato líquido, fosfato de sódio monobásico e água deionizada.

A solução padrão foi preparada pela solubilização e diluição em FM para obtenção de uma solução de valerato de betametasona ($6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$), clioquinol ($125,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e tolnaftato ($125,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). A solução amostra foi preparada pela transferência de 625 mg de creme para um tubo de plástico de 50 mL com tampa, adicionado 40 mL de FM, seguida de agitação por 20 minutos em vortex, transferência do conteúdo do tubo para balão volumétrico de 50 mL e diluição em FM. A solução amostra apresentou as mesmas concentrações dos fármacos da solução padrão.

Os compostos foram separados empregando uma coluna de 125 mm x 3,9 mm recheada com a FE Si-C8-uréia, FM acetonitrila:água pH 3,0 60:40 v/v, a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de 25 °C, detecção a 240 nm e volume de injeção de 5 μL . O método foi validado determinando as principais figuras de mérito.

3.2. Validação do método de separação de uma mistura de estatinas

A Figura 56 apresenta as estruturas químicas das estatinas atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina e sinvastatina. A mistura foi preparada a partir dos fármacos atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina e sinvastatina na concentração individual de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A separação de uma mistura de estatinas foi utilizada para avaliar a capacidade da FE Si-C8-uréia em separar compostos de estruturas químicas semelhantes e, por propor

uma metodologia com caráter investigativo, capaz de separar e quantificar as estatinas em medicamentos industrializados ou obtidos em farmácias de manipulação.

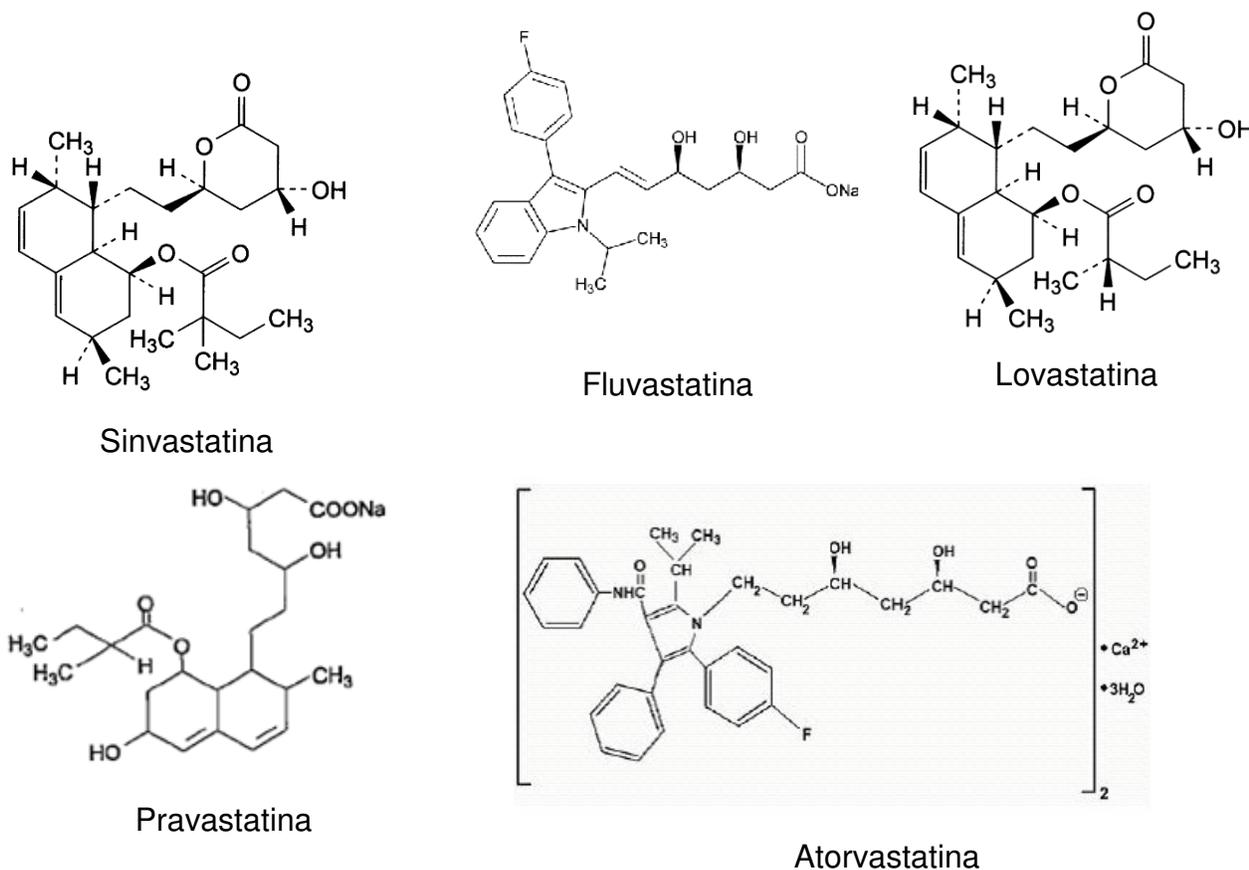


Figura 56 - Estrutura química das estatinas simvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina e atorvastatina.

Os compostos foram separados empregando uma coluna de 150 mm x 3,9 mm recheada com a FE Si-C8-uréia, FM acetonitrila/tetraidrofurano/água pH 3,0 47:18:35 v/v/v, a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹, temperatura de 35 °C, detecção a 238 nm e volume de injeção de 5 µL.

3.3. Validação do método de separação de cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina em xarope.

A aplicabilidade da FE Si-C8-uréia foi avaliada na separação de uma mistura formada por compostos de características básicas, cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina, Figura 57.

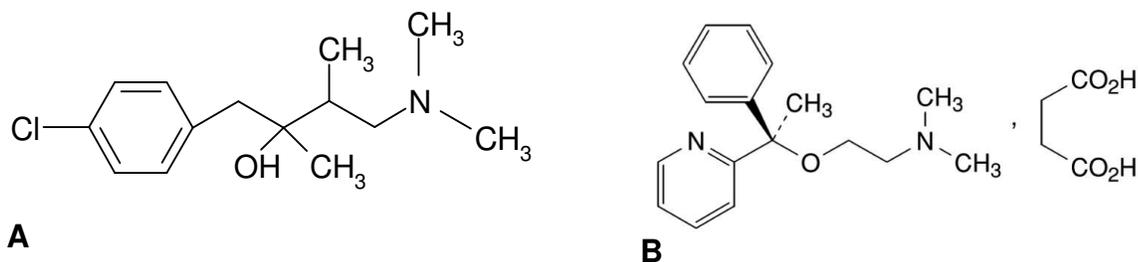


Figura 57 – Estrutura química do cloridrato de clobutinol (A) e succinato de doxilamina (B).

Os fármacos foram separados dos demais constituintes do xarope utilizando a nova FE preparada. O xarope de cloridrato de clobutinol ($4,0 \text{ mg mL}^{-1}$) e succinato de doxilamina ($0,75 \text{ mg mL}^{-1}$) apresentava os seguintes constituintes: ácido clorídrico, aroma de baunilha, aroma de cereja, benzoato de sódio, glicerol, hietelose, sacarina sódica diidratada, sorbitol e água deionizada.

A solução padrão foi preparada a partir da solubilização e diluição em FM para obtenção de uma concentração de cloridrato de clobutinol de $240,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e succinato de doxilamina de $45,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

A amostra de xarope foi agitada 5 minutos, em agitador mecânico, para assegurar a homogeneidade da solução, e a seguir uma alíquota de 6,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 100 mL. Um volume de 70 mL de FM foi adicionado ao balão, agitado por 15 minutos e o volume completado com FM. A solução amostra apresentou uma concentração de cloridrato de clobutinol de $240,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e succinato de doxilamina de $45,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os compostos foram separados empregando uma coluna de 150 mm x 3,9 mm, recheada com a FE Si-C8-uréia, FM consistindo de um tampão, metanol e acetonitrila, eluição por gradiente, temperatura de $25 \text{ } ^\circ\text{C}$, detecção a 230 nm para o cloridrato de clobutinol e a 262 nm para o succinato de doxilamina e volume de injeção de $5 \text{ } \mu\text{L}$. O método desenvolvido foi validado através da determinação das principais figuras de mérito.

3.4. Validação do método de separação de alprazolam e produtos de degradação

A separação do composto alprazolam, Figura 58, e dos compostos de degradação foi avaliada usando a FE Si-C8-uréia, recheada em uma coluna de 125 x 3,9 mm.

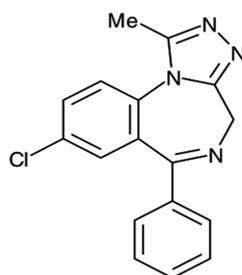


Figura 58 – Estrutura química do alprazolam.

A partir do placebo contendo os excipientes amido, benzoato de sódio, celulose microcristalina, dióxido de silício coloidal, docusato de sódio, estearato de magnésio, lactose monoidratada e óxido de ferro vermelho foi preparada uma solução para verificação dos interferentes na separação do alprazolam. A solução amostra de alprazolam comprimidos foi preparada a partir da pesagem de 20 comprimidos, maceração em grau de porcelana com auxílio de pistilo até a obtenção de um pó fino e homogêneo, seguida da pesagem do equivalente a 30 mg de alprazolam. O material pesado foi transferido para balão volumétrico de 100 mL, adicionado cerca de 70 mL de FM e o balão foi agitado por 30 minutos. Após esse período, o volume do balão foi completado com a FM e uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, seguida da diluição com FM. A solução amostra apresentou concentração de $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. A solução padrão foi preparada pela solubilização e diluição em FM para obtenção de uma solução de concentração de alprazolam de $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Soluções de amostras do comprimido de alprazolam 2 mg, diluente, placebo e padrão de alprazolam foram expostos às condições de degradação em meio ácido, alcalino, oxidativo, temperatura e luz para estudos dos produtos de degradação, sendo realizada a quantificação do alprazolam em todas as amostras estudadas.

As condições cromatográficas utilizadas foram FM metanol: água (40/60 v/v), vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, detecção a 254 nm e volume de injeção de $5 \mu\text{L}$.

3.5. Validação do método de separação de cloxazolam em comprimidos

A FE C8-uréia foi aplicada na separação de cloxazolam ($80,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), Figura 59, em comprimidos e também em matéria-prima. O método desenvolvido empregou uma coluna

de 125 mm x 3,9 mm recheada com a FE Si-C8-uréia, FM acetonitrila:triethylamina 0,1% em água pH 7,0 50:50 v/v, a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, temperatura de 25 °C, detecção a 244 nm e volume de injeção de 5 µL.

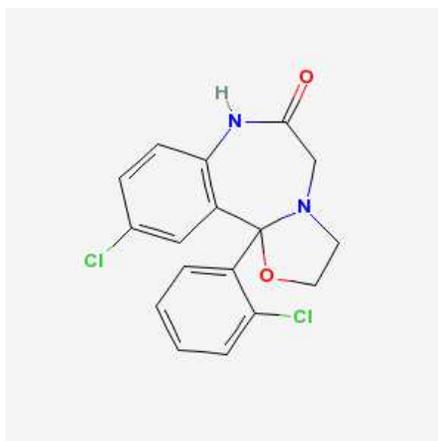


Figura 59 – Estrutura química do cloxazolam.

A partir do placebo contendo os excipientes óxido de ferro amarelo, estearato de mágnesio, talco, hidroxipropilcelulose, amido de milho e lactose foi preparada uma solução para verificação dos interferentes na separação da cloxazolam. A solução amostra foi preparada a partir da pesagem de 20 comprimidos, maceração dos comprimidos em grau de porcelana com auxílio de pistilo até a obtenção de um pó fino e homogêneo, seguida da pesagem do equivalente a 40 mg de cloxazolam. O material pesado foi transferido para balão volumétrico de 100 mL, adicionado cerca de 70 mL de FM e o balão foi agitado por 30 minutos. Após esse período, o volume do balão foi completado com a FM e uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, seguida da diluição com FM. A solução amostra apresentou concentração de 80,0 µg mL⁻¹. A solução padrão foi preparada pela solubilização e diluição em FM para obtenção de uma solução de concentração de cloxazolam de 80,0 µg mL⁻¹.

Soluções de amostras do comprimido de cloxazolam 4 mg, diluente, placebo e padrão de cloxazolam foram expostos às condições de degradação em meio ácido, alcalino, oxidativo, temperatura e luz para estudos dos produtos de degradação sendo realizada a quantificação do fármaco em todas as amostras estudadas.

3.5.1. Identificação das impurezas de cloxazolam

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um cromatografo a líquido (Agilent Série 1200) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Íon Trap (Agilent). O espectrômetro de massas está equipado com a fonte de ionização do tipo Z-spray para ionização por eletronebulização (ESI), modo positivo. A voltagem do cone e do capilar foram 3,5 kV e 35V, respectivamente. A temperatura da fonte foi mantida em 120 °C, enquanto que a temperatura de dessolvatação foi mantida em 350 °C. O gás nitrogênio foi usado no cone e como gás de nebulização e secante nas vazões de 30 e 300 L h⁻¹, respectivamente. O espectrômetro de massas foi operado no modo MS/MS, usando monitoramento de múltiplas reações (MRM). Hélio com pureza de 99,8% foi usado como gás de colisão, a uma pressão constante de 2×10⁻³ mbar.

4. Resultados e Discussão

4.1. Desenvolvimento e validação de método para separação da mistura de fármacos em creme com ação antiinflamatória e fungicida

A FE Si-C8-uréia foi usada na separação da mistura de anti-inflamatórios contendo os compostos valerato de betametasona, clioquinol e tolnaftato, Figura 60. Os fármacos em conjunto com a gentamicina são usados no tratamento tópico de dermatoses causadas por infecção bacteriana ou fúngica¹¹⁴. Individualmente os fármacos apresentam as características de antiinflamatório, antipruriginoso e vasoconstritor - valerato de betametasona, agente fungicida - tolinaftato e agente antibacteriano e antifúngico - clioquinol¹¹⁵.

Na Farmacopéia Americana⁵ são descritas apenas as metodologias para a separação e determinação individual dos fármacos citados e não a simultânea. Rizk *et al.*¹¹⁶ fizeram a determinação de clioquinol e iodoquinol com derivatização com paládio (II) seguida de separação cromatográfica utilizando coluna recheada com a FE fenil quimicamente ligada e FM constituída de uma mistura de ACN:MeOH:Água pH 7,0 30:30:40 v/v/v, contendo 0,005% de cloreto de paládio (II). Não houve interferência dos outros constituintes do produto, como a betametasona, obtendo boa separação entre os compostos. Saha e Bhattacharya¹¹⁷ realizaram a validação do método por CLAE para determinação de dipropionato de betametasona e tolinaftato em formulações farmacêuticas

semi-sólidas utilizando coluna Inertisil® ODS e FM constituída de ACN:MeOH:Água 60:15:25 v/v/v. Na separação, foram obtidos bons resultados para os parâmetros cromatográficos, como fator de assimetria entre 0,86 a 1,73 para dipropionato de betametasona e de 1,05 a 1,83 para tolnaftato e número de pratos maior que 11660 $N\ m^{-1}$ para ambos os compostos.

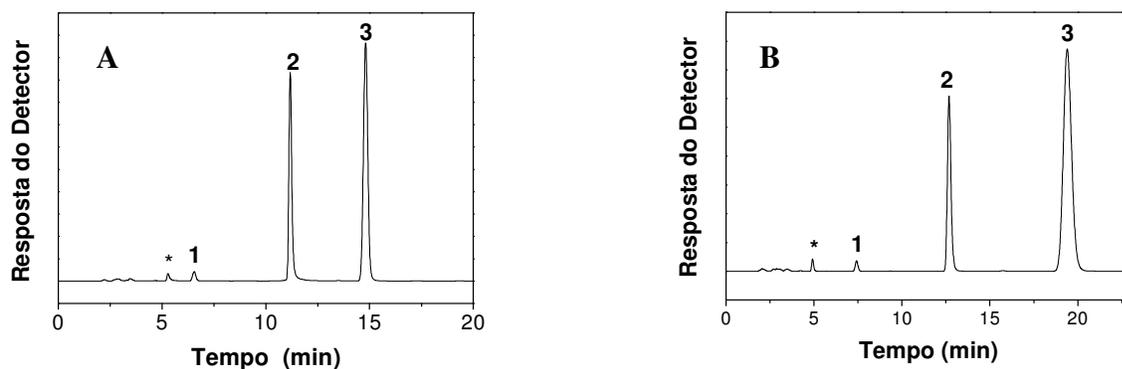


Figura 60 - Cromatogramas obtidos na separação da mistura de anti-inflamatórios em creme. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM: ACN:H₂O pH 3,0 (60:40 v/v); detecção UV a 240 nm e temperatura: 25 °C. A: vazão 1,2 $\text{mL}\ \text{min}^{-1}$ e B 1,0 $\text{mL}\ \text{min}^{-1}$. Compostos: 1-valerato de betametasona, 2-clioquinol, 3-tolnaftato, * excipiente.

O método proposto com a FE Si-C8-uréia separou com boa resolução e eficiência os três fármacos, com picos simétricos, conforme pode ser visualizado nos cromatogramas da Figura 60. O excipiente contido na formulação do creme, pico que eluido próximo a 5 minutos, não interferiu na separação dos fármacos. Nas duas vazões avaliadas, os compostos ativos presentes no creme foram separados do excipiente com boa resolução.

A Tabela 22 apresenta os parâmetros cromatográficos obtidos na separação mostrada na Figura 60, utilizando vazão de FM de 1,2 $\text{mL}\ \text{min}^{-1}$. Na separação cromatográfica os picos apresentaram pureza adequada comprovando que não há coeluição no tempo de retenção dos ativos. Os resultados obtidos para tolnaftato foram superiores aos descritos por Saha e Bhattacharya¹¹⁷ na separação de dipropionato de betametasona e tolnaftato.

Tabela 22: Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de valerato de betametasona, clioquinol, e tolnaftato na vazão de FM de 1,2 mL min⁻¹.

Composto	Pureza de pico	t _R (min)	k*	N/m	A _S	R _S
Valerato de Betametasona	0,9948	6,6	4,5	57432	1,0	----
Clioquinol	0,9977	11,2	8,3	239616	1,3	16,3
Tolnaftato	0,9991	14,9	11,4	170096	1,1	11,1

* t_M usado no cálculo do fator de retenção: 1,2

O método foi validado conforme os parâmetros descritos na Resolução RE 899/2003 da ANVISA⁷⁴. Os parâmetros de validação estão apresentados na Tabela 23. No parâmetro robustez foram avaliados a alteração do pH da FM, temperatura da coluna, dimensões da coluna para 150 x 3,9 mm e o sistema de CLAE. Os valores de recuperação do teor comparado ao valor obtido com a condição original do método variaram de 98,6 % a 99,8 %. A exatidão foi realizada pelo método de adição dos padrões ao placebo, obtendo recuperação do ativo adicionado de 98,7 a 100,5%. A precisão do método foi feita quanto ao critério de repetibilidade (mesmo dia) e intermediária (dias diferentes); os resultados obtidos para o coeficiente de variação ficaram abaixo de 5% para todos os ativos. O valor de F_{calculado} utilizando nível de confiança de 95% foi menor que o F_{tabelado} de 5,05. Os valores obtidos foram de 3,32; 3,36 e 3,46 para valerato de betametasona, tolnaftato e clioquinol, respectivamente. A faixa linear avaliada foi diferente para cada fármaco, pois foi usada a proporção entre os ativos presentes no medicamento Quadriderm®, empregado para validação do método¹¹⁸. A estabilidade das soluções foi avaliada injetando as soluções padrão e amostra dentro de um intervalo de 70 horas e foi verificada uma variação menor de 2,0% de área entre as replicatas.

Tabela 23: Figuras de mérito da validação do método na determinação valerato de betametasona, tolnaftato e clioquinol em pomada.

Composto	Precisão CV(%) Repetibilidade/ Intermediária	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)	Exatidão (%)			Faixa Linear (µg/mL)	Coeficiente de correlação (r)	
				80	100	120			
Valerato de Betametasona	1,2	2,2	0,1	0,2	98,9	98,7	99,1	0,2-15	0,9999
Tolnaftato	1,0	1,8	2,0	6,0	99,9	100,5	100,4	6,0-150	0,9998
Clioquinol	0,8	1,5	1,2	4,0	99,1	98,9	99,3	4,0-140	0,9998

O método desenvolvido e validado mostrou-se simples, rápido e seletivo. O método possibilitou a separação dos interferentes contidos no placebo do creme, sem interferir na quantificação dos fármacos. Os compostos separados apresentaram picos simétricos comprovando a baixa atividade silanofílica da FE Si-C8-uréia, pois devido às características básicas destes compostos poderiam interagir com os silanóis residuais e apresentar picos com cauda.

Desta forma, o método apresenta grande potencial para ser empregado na avaliação simultânea de valerato de betametasona, clioquinol e tolnaftato em creme, no controle de qualidade deste medicamento e também no estudo de estabilidade.

4.2. Validação do método para separação de uma mistura de estatinas

As estatinas são usadas como inibidores da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, no tratamento de dislipidemias e nas doenças cardiovasculares^{65,70}. As principais estatinas encontradas em medicamentos no Brasil são: sinvastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, rosuvastatina e lovastatina. Markamn *et al.*¹¹⁹ avaliaram a teor, dissolução e impureza em amostras de sinvastatina 20 mg manipuladas nas cidades de Campinas e de São Paulo e verificaram que entre as amostras analisadas havia algumas com baixo teor, dissolução e impurezas acima da especificação permitida pela farmacopéia⁵. O estudo foi relevante para evitar possíveis fraudes no uso destes compostos na produção de cápsulas. Desta forma, é importante que haja um método analítico capaz de separar, identificar e determinar as estatinas em medicamentos industrializados ou manipulados para evitar possíveis fraudes. Diversos métodos cromatográficos têm sido publicados para a separação de estatinas. Nováková *et al.*¹²⁰ realizaram uma revisão dos métodos por CLAE usados para determinar sinvastatina e atorvastatina em diversas áreas de aplicação como farmacologia, medicina e ambiental, dividindo-os de acordo com a técnica de detecção. O método de detecção que apresentou melhor seletividade e detectabilidade foi a CLAE acoplada ao espectrômetro de massas. Hefnawy *et al.*¹²¹ realizaram a determinação simultânea de sinvastatina e imatinibe em produtos farmacêuticos usando uma coluna monolítica, Chromolith® RP-18e e FM consistindo de uma mistura de ACN e tampão acetato de amônio 50 mmol L⁻¹ pH 5,0 65:35 v/v. Foram obtidos parâmetros cromatográficos como fator cauda de 0,94 para sinvastatina

e resolução de 12,3 entre a sinvastatina e imatinibe. Pasha *et al.*¹²² realizaram a separação de atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina em formulações farmacêuticas e em estudo de metabolismo “in vitro” de estatinas. O estudo foi realizado usando coluna Intertisil® ODS 3V e FM constituída de uma mistura de ACN:MeOH:tampão acetato de amônio 0,01 mol L⁻¹ pH 5,0. Foi obtida boa separação dos compostos, com tempos de retenção de 17,2, 21,6, 28,5, 33,5 e 35,5 minutos para atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina, respectivamente.

Uma mistura preparada com os padrões dos compostos pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, lovastatina e sinvastatina foi utilizada para avaliar a aplicação da FE Si-C8-uréia. A FE Si-C8-uréia separou os cinco fármacos, com picos simétricos, boa resolução e eficiência conforme pode ser observado na Tabela 24, na qual são apresentados os parâmetros cromatográficos de separação e cujo cromatograma está mostrado na Figura 61. Os picos foram identificados através da injeção individual de cada padrão e pela comparação do espectro UV obtido com o detector DAD. O método validado foi utilizado para quantificação dos compostos em cápsulas contendo os ativos e excipientes como lactose, estearato de magnésio e dióxido de titânio. O pico próximo à 2 minutos é referente à FM que elui no início da corrida cromatográfica.

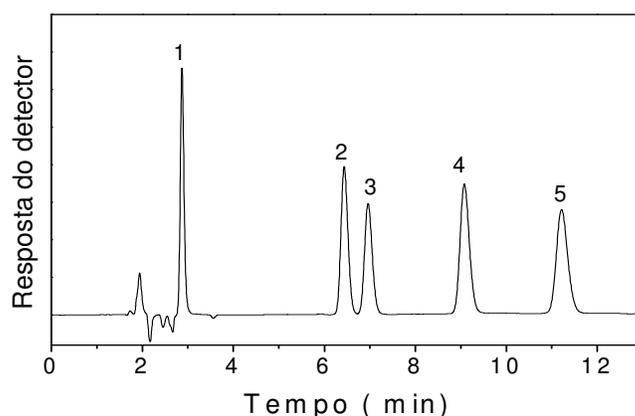


Figura 61 – Cromatograma obtido na separação de padrões das estatinas na concentração de 10 µg mL⁻¹. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; coluna Si-C8-uréia 150 x 3,9 mm; FM: ACN:THF:H₂O pH 3,0 47:18:35 v/v/v, vazão: 0,8 mL min⁻¹; detecção: UV a 238 nm e temperatura: 35 °C. Picos: 1- pravastatina, 2-atorvastatina, 3-fluvastatina, 4-lovastatina e 5-sinvastatina.

O teor de pureza obtido também está apresentado na Tabela 24. Os valores, em termos de quantidade de ativo por cápsula, estão de acordo com as especificações^{5,66}.

Tabela 24 - Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de estatinas.

Composto	t _R (min)	k*	N/m (m ⁻¹)	A _S	Pureza de Pico	Resolução (R _S)
Pravastatina	2,9	0,6	39027	1,2	0,9992	-----
Atorvastatina	6,4	2,6	52440	1,1	0,9989	16,4
Fluvastatina	7,0	2,9	54073	1,1	0,9981	1,8
Lovastatina	9,1	4,1	62213	1,1	0,9994	6,1
Sinvastatina	11,2	5,2	62206	1,2	0,9991	5,1

* t_M usado no cálculo do fator de retenção: 1,8

O método de análise para determinação das estatinas foi validado segundo as normas da Resolução 899/03 da ANVISA⁷⁴ e dos guias do ICH Q2A⁷⁷ e Q2B⁷⁸ que são os principais para validação de métodos cromatográficos para determinação de fármacos. As figuras de mérito avaliadas foram: seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão, robustez e estabilidade das soluções e estão apresentadas na Tabela 25.

Tabela 25 - Parâmetros de validação do método na determinação de estatinas.

Composto	Precisão		LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)	Exatidão (%)			Faixa Linear (µg mL ⁻¹)	Coeficiente de correlação (r)
	CV(%)	Repetibilidade /intermediária			80	100	120		
Pravastatina	0,66	1,10	0,44	2,0	99,1	99,4	101,2	2,0-120	0,9991
Atorvastatina	0,34	0,84	0,73	3,5	98,7	99,1	99,8	3,5-140	0,9994
Fluvastatina	0,31	0,71	0,81	4,0	99,3	100,2	101,1	4,0-160	0,9992
Lovastatina	0,52	0,93	0,74	4,0	99,1	100,3	100,8	4,0-120	0,9989
Sinvastatina	0,39	0,72	0,53	2,5	98,3	99,5	99,1	2,5-130	0,9999

Os valores de precisão para os cinco compostos estão de acordo com a especificação descrita na Resolução 899 da ANVISA⁷⁴ que é de 2,0 % para a repetibilidade e de 5,0 % para a precisão intermediária. O valor de F_{calculado} utilizando nível de confiança

de 95% foi menor que o F_{tabelado} de 5,05 para os compostos pravastatina, lovastatina e sinvastatina, sendo obtidos os valores de 2,88; 3,23 e 3,38, respectivamente. Para os compostos atorvastatina e fluvastatina o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi de 6,18 e 5,23, respectivamente. Estes valores estão acima da especificação para o nível de confiança de 95%, mas abaixo para o nível de 99% que corresponde ao valor de F_{tabelado} de 10,96.

A especificação da exatidão é que a recuperação esteja entre 98,0 % a 102,0 %. Na validação das estatinas, a exatidão foi avaliada ao nível de 80 %, 100 % e 120 % sobre uma concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e os resultados obtidos estiveram dentro de uma faixa de 98,3 % a 101,2 %, estando de acordo com a ANVISA⁷⁴. No estudo da robustez foram avaliadas as condições de alteração de vazão e proporção de constituintes da FM, temperatura, sistema de CLAE e do detector DAD. Os resultados para a robustez variaram de 98,3 % a 100,5 % com relação ao teor na condição original do método analítico. Os valores para o limite de detecção foram determinados pelo método do sinal ruído, sendo que o limite de quantificação foi considerado como o primeiro ponto da faixa linear.

O método desenvolvido e validado mostrou-se simples, rápido e seletivo, apresentando potencialidade na avaliação de estatinas em comprimidos e cápsulas, com as vantagens, em relação ao método oficial, de eliminação do tampão, da redução da temperatura e, principalmente, a análise simultânea das cinco estatinas. A separação cromatográfica foi obtida com excelente resolução entre os compostos, boa eficiência e picos simétricos. O método desenvolvido e validado para determinação de estatinas usando a FE Si-C8-uréia apresenta grande potencial para ser empregado na avaliação dos constituintes de medicamentos, seja no controle de qualidade de indústrias farmacêuticas ou de farmácias de manipulação.

4.3. Validação do método de separação de cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina em xarope.

A FE Si-C8-uréia foi usada no desenvolvimento e validação de um método para separação dos fármacos cloridrato de clobutinol (CLO) e succinato de doxilamina (DOX) em xarope. O cloridrato de clobutinol é um antitussígeno que combate a tosse seca e o succinato de doxilamina é um antialérgico que combate o acúmulo anormal de líquido nas paredes das vias respiratórias^{114,115}.

O CLO e DOX são descritos na Farmacopéia Americana⁵ por determinações individuais, sendo, desta forma, importante o desenvolvimento de um método analítico capaz de determinar simultaneamente os dois compostos e que seja um método indicador de estabilidade do produto. A determinação individual de CLO tem sido realizada por cromatografia a gás em fluido biológico¹²³, por derivatização em CLAE¹²⁴, determinação simultânea de CLO com fármacos anti-inflamatórios em urina¹²⁵ e por quantificação potenciométrica usando eletrodo seletivo ao complexo clobutinol-tetrafenil-borato¹²⁶. A determinação de DOX com outros compostos tem sido realizada, entretanto, não há relatos da separação com CLO. DOX tem sido determinada em combinação com maleato de carboxinamina por espectrofotometria¹²⁷, com brometo de dextrometofano por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC)¹²⁸, com cloridrato de pseudoefedrina por CLAE¹²⁹, com cloridrato de piridoxina por CLAE¹³⁰ e com outro anti-histamínico por CLAE¹³¹,

O método desenvolvido com a FE Si-C8-uréia apresentou uma boa resolução entre os compostos cloridrato de clobutinol, succinato de doxilamina e os excipientes presentes na amostra de xarope analisada, conforme pode ser visualizado nos cromatogramas da Figura 62. O método foi validado¹³², segundo a resolução da ANVISA RE 899⁷⁴.

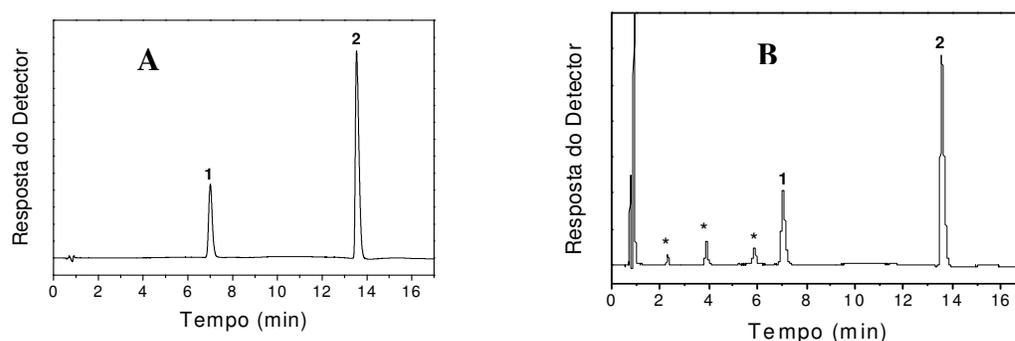


Figura 62 – Cromatogramas obtidos na separação dos compostos (1) succinato de doxilamina e (2) cloridrato de clobutinol. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; coluna recheada com a FE Si-C8-uréia de 125 x 3,9 mm; FM: gradiente MeOH:ACN:tampão KH_2PO_4 pH 3,0; detecção: 262 nm para o succinato de doxilamina e a 230 nm para o cloridrato de clobutinol; temperatura: 25 $^\circ\text{C}$. A - padrão, B - amostra de xarope, * excipientes.

O modo de eluição usado, gradiente, foi eficaz na separação dos compostos ativos em meio a vários excipientes como conservantes e anti-oxidantes. A Tabela 26 apresenta

a composição do gradiente usado na separação dos compostos cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina e a Tabela 27 os parâmetros cromatográficos obtidos na separação mostrada na Figura 62. Na Tabela 28 estão apresentadas as figuras de mérito avaliadas na validação do método analítico.

Tabela 26: Gradiente de FM usado na separação de cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina.

Tempo (min)	Tampão %	MeOH %	ACN %
0	77	0	23
5,0	77	0	23
8,0	71	2	27
12,5	71	2	27
13,5	71	2	27
14,0	71	2	27
15,0	77	0	23
17,0	77	0	23

Tabela 27: Parâmetros cromatográficos da separação de cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina.

Composto	Pureza de pico	t_R (min)	k^*	N/m (m^{-1})	A_s	R_s
Succinato de doxilamina	0,9991	7,0	4,8	71712	1,1	-----
Cloridrato de clobutinol	0,9993	13,6	10,4	108112	1,2	12,5

* t_M usado no cálculo do fator de retenção: 1,2

Tabela 28: Figuras de mérito obtidas na validação do método na determinação cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina em xarope.

Composto	Precisão CV(%)		LD $\mu\text{g/mL}$	LQ $\mu\text{g/mL}$	Exatidão (%)			Faixa Linear $\mu\text{g/mL}$	Coeficiente de correlação (r)
	Repetibilidade/ Intermediária				80	100	120		
Succinato de doxilamina	0,63	0,85	0,55	2,3	98,8	99,1	99,2	2,3-63	0,9999
Cloridrato de clobutinol	0,45	0,96	0,45	2,4	98,4	99,2	100,2	2,4-336	0,9999

A figura de mérito robustez foi avaliada quanto à alteração do pH do tampão da FM, vazão e proporção de componente orgânico na FM e temperatura da coluna. Na avaliação da robustez, os valores de recuperação do teor comparado ao valor obtido com a condição original do método variaram de 98,1 % a 99,3 %. A exatidão foi realizada pelo método de

adição dos ativos ao placebo. Os resultados obtidos de recuperação dos ativos adicionados foram de 98,4 a 100,2 % para CLO e 98,8 a 99,2 para DOX. A precisão do método foi realizada quanto ao critério de repetibilidade (mesmo dia) e intermediárias (dias diferentes); os resultados obtidos de coeficiente de variação ficaram abaixo de 5% para todos os ativos, conforme Tabela 25. O valor de $F_{\text{calculado}}$ utilizando nível de confiança de 95% foi menor que o F_{tabelado} de 5,05. Os valores obtidos de F variaram de 1,82 e 4,52 para CLO e DOX, respectivamente. A estabilidade das soluções foi avaliada injetando as soluções padrão e amostra dentro de um intervalo de 48 horas e foi verificada uma variação menor de 2,0% de área entre as replicatas para as soluções amostra e padrão.

O estudo de estabilidade é uma parte integral no desenvolvimento do produto. As informações obtidas durante o estudo de estabilidade permitem determinar o tempo de vida útil do medicamento, condições de estocagem e o perfil de impurezas provenientes do fármaco e de interações deste com outros ativos, excipientes e embalagem. O método desenvolvido deve ser capaz de permitir a separação entre esses compostos e, desta forma, ser considerado como um método indicador de estabilidade. Amostras dos fármacos CLO e DOX e também amostras do xarope e placebo foram avaliadas nos seguintes meios de degradação em temperatura de 80 °C, ácido, solução de HCl 0,1 mol L⁻¹, alcalino, solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, oxidativo, com H₂O₂ a 10% e fotolítico em presença de luz UV durante 24 horas. Os resultados estão apresentados na Tabela 29. As concentrações teóricas dos fármacos nas amostras foram de 4,0 mg mL⁻¹ para CLO e 0,75 mg mL⁻¹ para DOX.

Tabela 29 – Teor para amostras de xarope contendo CLO e DOX expostas às condições de degradação.

Condições de degradação	Concentração do fármaco obtida (mg mL ⁻¹)		Pureza de pico		R _S *
	CLO	DOX	CLO	DOX	
Controle (sem degradação)	4,0	0,75	0,9993	0,9991	12,5
Hidrólise ácida	3,9	0,73	0,9985	0,9988	12,0
Hidrólise básica	3,8	0,72	0,9974	0,9982	12,4
Oxidação	2,4	0,38	0,9915	0,9939	10,3
Temperatura	3,8	0,73	0,9956	0,9965	10,3
Luz UV	3,9	0,71	0,9983	0,9948	11,8

* Resolução entre CLO a DOX.

As amostras foram analisadas de acordo com as condições do método validado e nos cromatogramas obtidos não foram observados picos originados da degradação dos fármacos e o teor das amostras analisadas também não apresentou alteração significativa, exceto para a condição oxidativa na qual ocorreu queda de 40 % e 50 % para CLO e DOX, respectivamente. Os picos para os fármacos CLO e DOX apresentaram pureza adequada em todas as condições avaliadas.

Os excelentes resultados obtidos para os parâmetros cromatográficos, como o fator de assimetria de 1,1 para a DOX, comprovam a baixa atividade silanófilica da FE Si-C8-uréia. O método desenvolvido e validado mostrou-se simples, rápido e seletivo, podendo ser empregado na avaliação simultânea de CLO e DOX em xarope para o controle de qualidade deste medicamento. O método desenvolvido possibilitou a separação dos produtos de degradação, excipientes e ativos do xarope, comprovando a seletividade do método e apresentou excelente potencialidade como um método indicador de estabilidade.

4.4. Validação do método de separação de alprazolam e produtos de degradação

Alprazolam é um benzodiazepínico derivado do 1,4-benzodiazepínico. Como fármaco é usado como ansiolítico no tratamento de ansiedade, de depressão e de distúrbios do pânico^{114,115}.

O método da Farmacopéia Americana USP⁵ para determinação da dissolução de alprazolam em comprimidos descreve como condição cromatográfica o uso de FM composta de tampão fosfato pH 6,0: tetraidrofurano (THF): acetonitrila 60:35:5 e coluna recheada com FE C8. O método para determinação do teor de alprazolam em matéria-prima, segundo a USP¹⁶, é ainda mais complexo, uma vez que utiliza FM composta de ACN:clorofórmio:álcool butílico:H₂O:ácido acético 850:80:50:20:0,5 e coluna de sílica.

Lozano *et al.*¹³³ realizaram um estudo para separar alprazolam de impurezas, utilizando FM constituída de tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹: ACN 45:55 v/v e coluna ODS C18. Os parâmetros cromatográficos obtidos para alprazolam e impurezas foram: fator de retenção entre 2,2 a 7,5; número de pratos de 39896 a 89587 pratos m⁻¹ e resolução de 5,3 para a impureza mais próxima. O método de separação cromatográfico desenvolvido com a FE Si-C8-uréia para o alprazolam permitiu o uso de FM sem adição de tampão e com menor porcentagem do modificador orgânico. A melhor condição obtida de FM foi composta de MeOH:H₂O na proporção de 40:60 v/v.

A determinação dos produtos de degradação faz parte dos requisitos para determinação do prazo de validade dos medicamentos^{86,87,105} e para comprovar a seletividade do método⁷⁴. Esse estudo é solicitado às indústrias farmacêuticas quando vão registrar um novo medicamento ou na renovação do registro. Nudelman e Carrera¹³⁴ realizaram o isolamento e a caracterização estrutural dos produtos de degradação, no estudo de fotoestabilidade de comprimidos de alprazolam. A separação cromatográfica foi feita em uma coluna Lichrosorb RP-8 e FM constituída de tampão fosfato-citrato e metanol. Huidobro *et al.*¹³⁵ fizeram o isolamento do principal produto de degradação de alprazolam no estudo de estabilidade, utilizando coluna semi-preparativa Zorbax® ODS e FM constituída de tampão acetato de amônio e ACN 45:55 v/v. A separação analítica foi realizada em uma coluna Hypersil® ODS e FM de tampão fosfato de potássio e ACN 45:55 v/v. Os resultados obtidos mostraram boa separação, com parâmetros cromatográficos de acordo com as especificações do ICH. Pathak e Rajput¹³⁶ realizaram o estudo de estabilidade e a separação dos produtos de degradação de alprazolam e cloridrato de sertralina, usando coluna C18 e FM constituída de tampão fosfato pH 4, ACN e MeOH 50:45:5 v/v/v. Os resultados mostraram que produtos de degradação formados nos comprimidos durante o estudo de estabilidade de longa e curta duração foram semelhantes aos obtidos no estudo de degradação.

O estudo de degradação forçada usando a FE Si-C8-uréia foi realizado pela exposição do diluente, placebo, amostra de comprimido de alprazolam 2 mg e padrão de alprazolam nas seguintes condições: degradação ácida (HCl 0,1 mol L⁻¹); degradação básica (NaOH 0,1 mol L⁻¹); degradação oxidativa (H₂O₂ 3%); temperatura (70 °C/48 horas) e luz^{86,87,105}. Este estudo foi feito para o composto alprazolam e, entre as condições testadas, a que apresentou maior degradação do alprazolam foi com peróxido, conforme apresentado no cromatograma do padrão, Figura 63. O pico cromatográfico com tempo de retenção de 6,21 minutos corresponde ao alprazolam. Os picos em 4,13; 7,25; 8,74 e 10,53 minutos são originados na degradação do alprazolam, pois não aparecem no cromatograma do diluente e do placebo sob a mesma condição de degradação. O estudo de degradação é importante no desenvolvimento do método analítico, pois possíveis impurezas que possam surgir no medicamento durante o período de validade, devido à reações de hidrólise ácida, básica e oxidação, podem ser identificadas no método de análise^{87,133,136}.

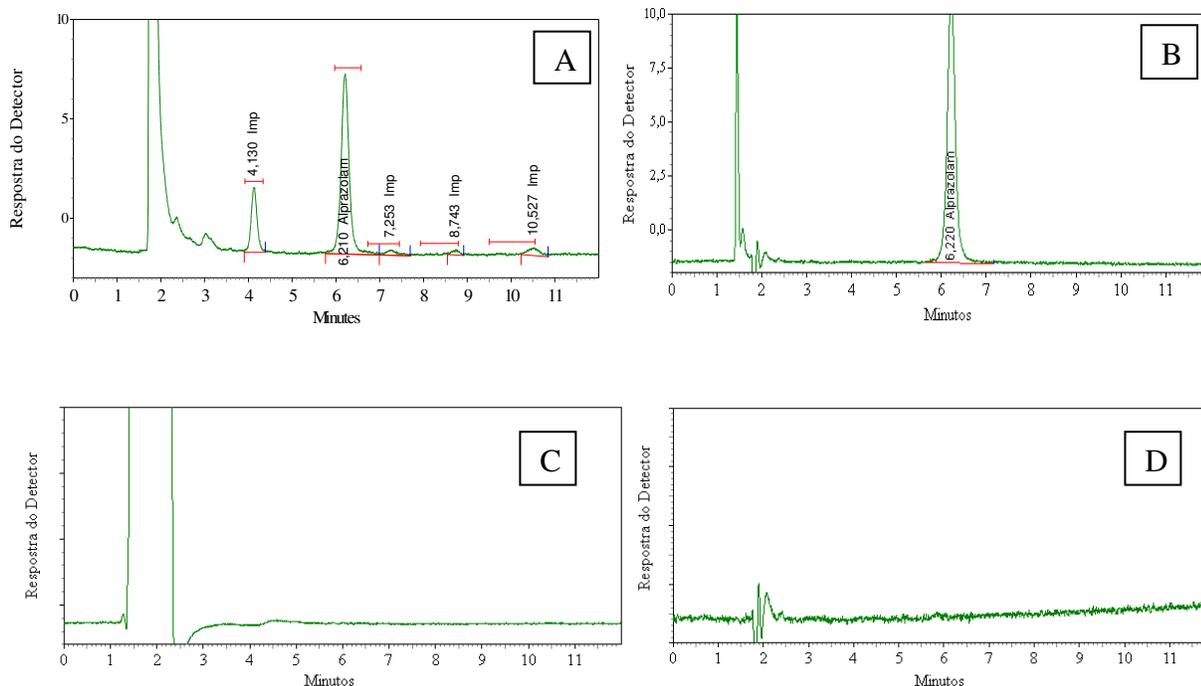


Figura 63 – Cromatogramas obtidos no estudo de degradação forçada do alprazolam em meio oxidativo (peróxido 3 %). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM: MeOH:H₂O (40:60 v/v), vazão: 0,6 mL/min; detecção UV a 254 nm e temperatura de 25 °C. Cromatograma A – meio oxidativo, B – Controle, C – Placebo e D – FM.

Huidobro *et al.*¹³⁵ obtiveram a separação com tempo de retenção próximo a 5 minutos para o alprazolam e próximo a 9 minutos para o principal produto de degradação. Realizando o cálculo de tempo de retenção relativo (t_{RR}) em relação ao alprazolam, na separação mostrada na Figura 63, as impurezas em 8,7 e 10,5 minutos apresentam t_{RR} 1,41 e 1,69, respectivamente. No estudo realizado por Huidobro *et al.*¹³⁵, o valor t_{RR} para o degradante foi de 1,73. No presente estudo, não foi realizado o isolamento ou a caracterização por espectrometria de massas ou RMN de ¹H e ¹³C das impurezas, entretanto, os resultados obtidos são indicativos que o método pode ser considerado indicador de estabilidade por separar as impurezas provenientes da degradação do alprazolam.

A Tabela 30 apresenta os parâmetros cromatográficos obtidos no estudo de degradação forçada do alprazolam em meio oxidativo. O pico referente ao alprazolam apresentou pureza de pico acima de 0,99 indicando que não deve haver outros compostos eluindo no mesmo tempo de retenção do alprazolam.

Tabela 30: Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de alprazolam e impurezas.

Nome	t_R (min)	Área	k^*	N/m (m^{-1})	A_s	Pureza de pico	R_s
Impureza	4,1	124755	2,3	35952	1,0	0,987	-----
Alprazolam (solução padrão)	6,2	473083	4,0	49600	1,0	0,997	7,3
Alprazolam (solução amostra)	6,2	471058	4,0	47384	1,0	0,996	7,3
Impureza	7,2	12154	4,8	55432	0,9	0,989	2,7
Impureza	8,7	12987	6,0	75690	0,9	0,991	7,8
Impureza	10,5	12433	7,5	91592	1,0	0,985	6,9

* t_M usado no cálculo do fator de retenção: 1,24

A validação do método de alprazolam em comprimidos foi realizada calculando-se as figuras de mérito de seletividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez. A Tabela 31 apresenta os valores obtidos para os parâmetros validação.

Tabela 31: Figuras de mérito da validação do método na determinação de alprazolam em comprimidos.

Composto	Precisão		LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)			Faixa Linear ($\mu\text{g/mL}$)	Coeficiente de correlação (r)
	Repetibilidade Intermediária CV (%)				80	100	120		
Alprazolam	0,87	1,35	0,47	1,3	98,5	98,0	98,8	1,3-40	0,9999

A exatidão foi verificada pelo método de adição do ativo ao placebo. Os resultados obtidos para recuperação do ativo adicionado foi de 98,0 a 98,8 %. A precisão do método foi avaliada quanto critério de repetibilidade (mesmo dia) e intermediária (dias diferentes); os resultados obtidos de coeficiente de variação ficaram abaixo de 5% para o ativo, conforme Tabela 31. O valor de $F_{\text{calculado}}$ de 2,36, utilizando nível de confiança de 95%, foi menor que o F_{tabelado} de 5,03, indicando que não há diferença significativa entre as duas precisões. A Figura 64 apresenta a curva analítica e gráfico de resíduos obtidos para linearidade.

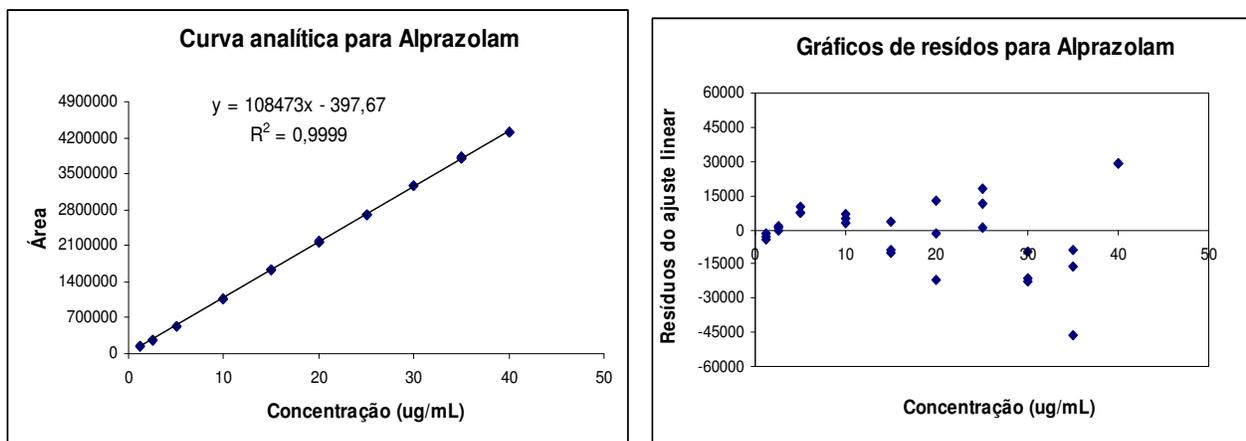


Figura 64 – Curva analítica e gráfico de resíduos para alprazolam.

A distribuição dos resíduos do ajuste linear não apresentou tendência, mostrando dados aleatórios em torno do eixo zero. O método apresentou linearidade dentro da faixa de concentração avaliada.

Um dos parâmetros avaliados na validação do método de alprazolam foi a robustez do método onde foram estudadas alterações nas condições de análise como alteração da vazão e proporção de FM, temperatura, coluna e sistema cromatográfico. Na Tabela 32 estão mostrados os resultados obtidos no estudo da robustez.

A recuperação de alprazolam foi calculada em relação à condição original do método.

Tabela 32 – Resultados obtidos na determinação da robustez do método para alprazolam.

Condição	Recuperação (%)	CV %
FM 0,7 mL/min	98,9	1,2
FM 0,5 mL/min	98,8	1,2
Temperatura 30 °C	99,5	0,9
Temperatura 20 °C	99,4	0,8
FM 55/45 H ₂ O-ACN	99,3	1,0
FM 65/35 H ₂ O -ACN	99,5	1,1
Coluna Si-C8-uréia 60 x 3,9 mm	99,1	1,2
Equipamento CLAE e Detector UV	98,9	0,8

Na avaliação da seletividade foram avaliados também a exposição das soluções amostra, padrão e placebo à luz e temperatura. O placebo não interferiu na separação do alprazolam. A recuperação do analito nas condições testadas estão de acordo com a RE 899/2003⁷⁴ da Anvisa e estão apresentados na Figura 65.

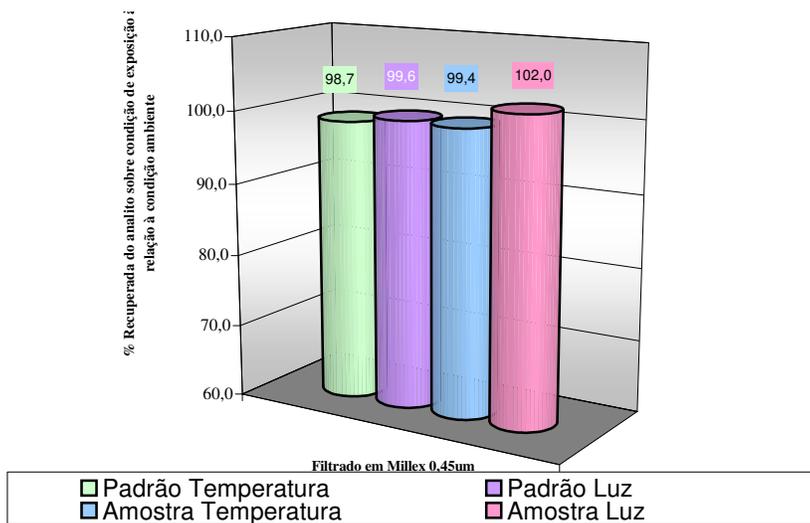


Figura 65 - Gráfico representativo das recuperações de padrão temperatura e luz e amostra luz em relação ao padrão e amostra na temperatura ambiente e em vidraria âmbar.

O estudo de estabilidade foi feito a partir de uma solução padrão e uma solução amostra, preparados conforme o método inicial. Injeções dessas soluções foram feitas a cada três horas durante um período de 48 horas para que fosse possível avaliar a alteração das áreas dos picos em cada tempo. O valor obtido de área foi calculado em termos percentuais da área obtida inicialmente. A Figura 66 apresenta o gráfico da estabilidade da solução amostra. A solução padrão também apresentou estabilidade durante as primeiras 48 horas de preparação.

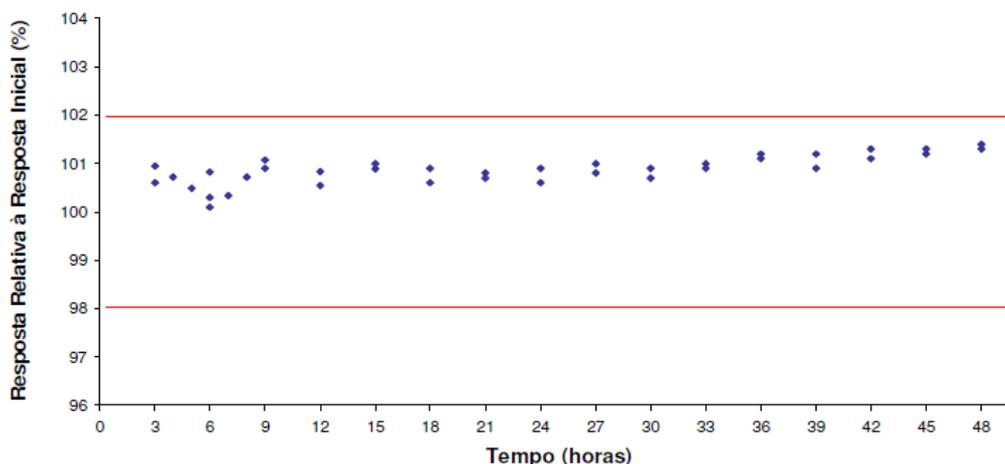


Figura 66 - Gráfico representativo da estabilidade da solução amostra de alprazolam em comprimidos.

O método de separação cromatográfica desenvolvido e validado para o alprazolam em comprimidos usando a FE Si-C8-uréia e FM metanol e água permitiu uma separação eficiente, com resolução maior que 2,5 para todas as impurezas e fármaco, bem como picos simétricos. O método também possui como vantagem o uso de FM sem uso de tampão e o uso do modificador orgânico metanol, apresentando menor custo comparado ao método proposto pela USP⁵. O método proposto pode ser considerado indicador de estabilidade, pois permite a separação entre os produtos de degradação e alprazolam, podendo ser usado nos estudos de estabilidade de longa e curta duração.

4.5. Separação de cloxazolam em comprimidos

O cloxazolam é um derivado 1,3-benzodiazepínico sintetizado inicialmente pela Snakyo Research Laboratories, em 1974 e apresenta características básicas com pKa de 7,4. O fármaco é usado no tratamento da depressão, síndrome do pânico, ansiolítico, hipnótico, relaxante muscular e também apresenta efeitos antiepilépticos¹³⁷. Cloxazolam como medicamento encontra-se disponível na forma farmacêutica sólida em comprimidos de 4 mg, 2 mg e 1 mg e faz parte da lista B1 segundo a qual a venda é regulada pela Portaria 344 da ANVISA¹³⁸.

O método utilizado para a determinação da matéria-prima de cloxazolam é descrito apenas na farmacopéia japonesa¹³⁹ e consiste na titulação potenciométrica em meio não aquoso com solução titulante de ácido perclórico. Esse método é aplicado apenas para

determinação do composto puro, pois não possui seletividade para diferenciar o composto ativo de impurezas, excipientes contidos no comprimido e de compostos de degradação. Para avaliação de impurezas a farmacopéia japonesa descreve o uso de cromatografia em camada delgada que é um teste limitante e não avalia as impurezas em potencial desse fármaco. O método para determinar a quantidade de cloxazolam em comprimido tanto quanto ao teor do fármaco como de dissolução é o espectrofotométrico, que também não possui a seletividade necessária para separar o cloxazolam de eventuais impurezas. Uma informação que tem chamado atenção até a presente data é que o prazo de validade do medicamento, fabricado com o fármaco ativo cloxazolam, foi alterado de 24 meses para 18 meses¹⁰⁸. Uma possível explicação para tal fato seria a instabilidade do medicamento por um período maior que 18 meses, o que poderia ocasionar formação de compostos de degradação.

A separação e a determinação de cloxazolam têm sido realizadas por polarografia¹⁴⁰, avaliando o efeito do pH no intervalo de 1 a 12. No estudo foram obtidos bons resultados para quantificação de cloxazolam em comprimido de 1 mg, o meio utilizado evitou o processo de hidrólise previsto nos métodos por espectrofotometria e fluorometria para esse fármaco. Na revisão da literatura não foram encontradas, até a presente data, publicações sobre a separação cromatográfica por CLAE com detecção por ultravioleta para cloxazolam em comprimidos. Os métodos publicados para cloxazolam avaliam o fármaco em presença de outros compostos, geralmente em fluídos biológicos. A metodologia comumente aplicada é cromatografia com detecção por espectrometria de massas. Maurer e Pflieger¹⁴¹ desenvolveram uma metodologia para identificação e diferenciação de 29 benzodiazepínicos, incluindo cloxazolam, em amostras de urina por cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas. Inoue *et al.*¹⁴² avaliaram e determinaram cloxazolam e outros benzodiazepínicos em amostras de sangue, utilizando extração em fase sólida e análise por cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas. A separação por CLAE de cloxazolam e outros benzodiazepínicos foi feita por Rodrigues *et al.*¹⁴³ em amostra biológicas utilizando extração em fase sólida e análise com detecção eletroquímica. Laloup *et al.*¹⁴⁴ fizeram a validação da metodologia por CLAE com detecção por espectrometria de massas de cloxazolam e mais 25 benzodiazepínicos em amostra de sangue, urina e cabelo. A separação foi realizada em coluna XTerra® MS C18 e FM metanol e tampão formiato. Miyaguchie *et al.*¹⁴⁵ realizaram a separação de vários fármacos

hipnóticos e sedativos por CLAE com detecção por espectrometria de massas, utilizando coluna Symmetry® C18 e como FM metanol e tampão acetato de amônio em eluição por gradiente. Entre outras metodologias utilizadas para separação de cloxazolam, a cromatografia em camada delgada de alta eficiência foi utilizada por Otsubo *et al.*¹⁴⁶ na detecção de cloxazolam e outros benzodiazepínicos em amostras de plasma humano. Jinno *et al.*¹⁴⁷ realizaram a comparação entre a separação de cloxazolam e outros benzodiazepínicos empregando eletrocromatografia capilar de tubo aberto e fechado. Suzuki *et al.*¹⁴⁸, separaram cloxazolam e benzodiazepínicos por eletroforese capilar, usando como tampão sulfato de dextrana e lauril sulfato de sódio. Os resultados obtidos permitiram boa separação entre todos os compostos analisados. O método descrito no guia de colunas Hypersil¹⁴⁹ descreve o uso de FM constituída de metanol:tampão de ácido fórmico 0,1%. Foi obtida boa separação do cloxazolam, entretanto, na aplicação do método para a separação de uma mistura de benzodiazepínicos, o cloxazolam elui juntamente com a FM no t_M .

O desenvolvimento e validação de um método cromatográfico para a determinação de cloxazolam e impurezas em matéria-prima e comprimidos é útil para monitorar a qualidade desse medicamento no prazo de validade estipulado.

4.5.1. Desenvolvimento de método para a determinação do teor de cloxazolam em comprimidos.

Inicialmente, a FM testada na separação do cloxazolam foi constituída de metanol (MeOH) e/ou acetonitrila (ACN) e água sem ajuste de pH. Como não foram obtidos bons resultados tentou-se o ajuste de pH da FM e também o uso de tampão em pH ácido e neutro.

A condição cromatográfica com tampão fosfato pH 7,0 apresentou melhor resultado quando comparada às condições de FM com uso de modificador orgânico e água e também em pH ácido com adição de ácido fosfórico. Com o aumento da proporção de tampão foi obtida melhor eficiência na separação, com pico simétrico. A partir dessa condição de pH neutro com melhor separação para o cloxazolam foram testadas outras condições em pH neutro sem a utilização de sais para tamponar a FM.

A Tabela 33 mostra os parâmetros cromatográficos obtidos com as FM estudadas. A vazão utilizada foi de 0,6 mL min⁻¹, coluna Si-C8-uréia nas dimensões de 125 x 3,9 mm e volume de injeção de 20 µL.

Tabela 33 – Parâmetros cromatográficos obtidos no estudo de seleção da FM.

Composição da FM	t _R (min)	N / m (m ⁻¹)	A _S
MeOH : H ₂ O 60:40 v/v	3,3	5672	1,2
ACN : MeOH : H ₂ O 10:50:40 v/v/v	7,0	9320	1,0
ACN : H ₂ O 60/40 v/v	6,9	13432	1,8
MeOH : H ₃ PO ₄ 0,1% 55/45 v/v (pH 2,8)	2,7	14456	1,4
MeOH : H ₃ PO ₄ 0,1% 44/66 v/v (pH 2,8)	3,0	22688	1,7
ACN : MeOH : Tampão fosfato pH 7,0 (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O) 55:10:35 v/v/v	3,8	49544	1,1
ACN : MeOH : Tampão fosfato pH 7,0 (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O) 37:14:49 v/v/v	9,7	63720	0,97

A primeira condição avaliada foi o uso de trietilamina (TEA) com correção do pH para 7,0 com ácido fosfórico a 10% v/v. A vazão de FM usada no teste foi de 1,0 mL min⁻¹. A Tabela 34 apresenta os parâmetros cromatográficos obtidos com a FM contendo TEA.

Tabela 34 - Parâmetros cromatográficos obtidos no estudo da seleção da FM usando TEA.

Composição da FM e volume de injeção (µL)	t _R (min)	N / m (m ⁻¹)	A _S
ACN : MeOH : TEA 0,1% pH 7,0 55:10:35 v/v/v (20 µL)	3,7	31752	0,97
MeOH : TEA 0,1% pH 7,0 35:65 v/v (20 µL)	3,7	22832	0,8
ACN : TEA 0,1% pH 7,0 35:65 v/v (10 µL)	3,3	56776	1,1
ACN : TEA 0,1% pH 7,0 35:65 v/v (20 µL)	3,3	38288	1,1
ACN : TEA 0,1% pH 7,0 50:50 v/v (20 µL)	6,2	43448	1,0

Nas condições avaliadas usando ACN e TEA, o cloxazolam foi separado com boa eficiência, picos simétricos e na condição de 50:50 v/v, entre ACN e a solução de TEA, foi obtido maior tempo de retenção. Esta condição apesar de menor eficiência fornece uma eluição com maior tempo de retenção que poderá apresentar melhor separação no estudo

de degradação. Com a redução do volume de injeção de 20 μL para 10 μL foi obtida melhor eficiência devido à redução de material injetado na coluna cromatográfica. A substituição de ACN por MeOH na FM não apresentou boa eficiência na separação e o pico obtido apresentou cauda frontal. Apesar da condição com TEA na FM apresentar menor eficiência na separação cloxazolam comparada ao uso de tampão com fosfato de sódio, a TEA foi escolhida por ser menos agressiva à FE e por apresentar um menor tempo de análise.

A composição da FM escolhida para a separação do cloxazolam foi ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50:50 v/v. Para avaliar a influência da TEA na separação do cloxazolam foi feito um estudo da concentração de TEA na FM. Foram avaliadas as concentrações de 1,0%, 0,5%, 0,25%, 0,1% e 0,05%. O volume utilizado nas injeções foi de 5 μL . A Tabela 35 apresenta os resultados de parâmetros cromatográficos obtidos com a variação da concentração de TEA na FM.

Tabela 35 – Parâmetros cromatográficos obtidos no desenvolvimento do método de cloxazolam avaliando a composição da solução de TEA.

Composição da FM	t_R (min)	N / m (m^{-1})	A_S
ACN : TEA 0,05% pH 7,0 50:50 v/v	6,3	60280	0,94
ACN : TEA 0,1% pH 7,0 50:50 v/v	6,1	67880	0,96
ACN : TEA 0,25% pH 7,0 50:50 v/v	6,1	61512	0,97
ACN : TEA 0,5% pH 7,0 50:50 v/v	6,1	65464	0,97
ACN : TEA 1,0 % pH 7,0 50:50 v/v	6,1	68088	0,98

A eficiência e fator de assimetria obtidos com a FM contendo TEA na concentração de 0,1% foram semelhantes aos valores obtidos com a concentração de 1,0%, assim, devido ao menor grau de saturação da coluna com a TEA, foi escolhida a concentração de 0,1% de TEA na FM.

Para otimizar o método analítico, com relação ao volume de injeção usado na análise cromatográfica do cloxazolam, foram avaliados os volumes de 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 μL . Para cada volume de injeção foram realizadas injeções em triplicata para avaliar a variação entre as injeções. A Tabela 36 apresenta os parâmetros cromatográficos obtidos neste estudo.

Tabela 36 – Parâmetros cromatográficos obtidos no estudo de volume de injeção.

Volume de injeção (µL)	t _R (min)	N / m (m ⁻¹)	A _S	CV das injeções (%)
1,0	6,2	75576	1,1	0,35
5,0	6,2	75328	0,98	0,14
10,0	6,2	64344	1,0	0,12
15,0	6,2	54312	1,0	0,11
20,0	6,2	43448	1,0	0,12
30,0	6,2	23240	0,85	0,13
40,0	6,1	15000	0,79	0,11
50,0	6,1	10592	0,64	0,11

Como não houve praticamente diferenças entre os valores dos parâmetros cromatográficos obtidos com o volume de 1 e 5 µL, optou-se pelo volume de 5 µL por apresentar maior repetibilidade entre as injeções.

A FE Si-C8-uréia separou satisfatoriamente o composto cloxazolam dos excipientes presentes no comprimido conforme pode ser visualizada no cromatograma da Figura 67. A separação foi obtida com eficiência de 75600 N/m, fator de assimetria de 1,0 e tempo retenção de aproximadamente 6,2 minutos.

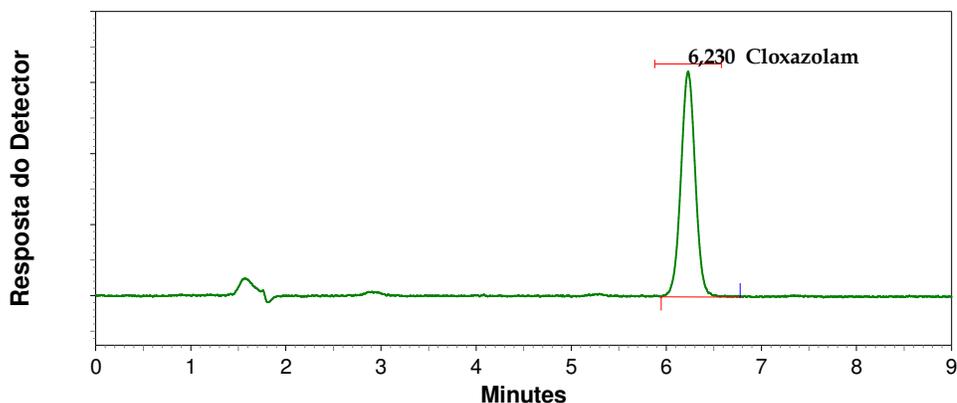


Figura 67 – Cromatograma obtido na separação de cloxazolam em comprimidos. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 µL; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm. FM: ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50/50 v/v, vazão 1,0 mL/min; detecção UV a 244 nm e temperatura: 25 °C.

A Figura 68 apresenta o espectro de absorção do cloxazolam na faixa de 200 a 400 nm e o espectro tridimensional para a condição cromatográfica de separação obtida para o cloxazolam.

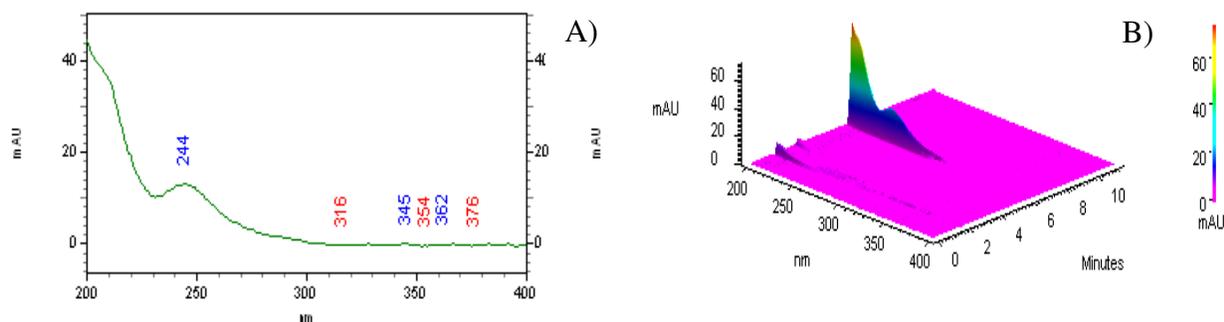


Figura 68 – Espectro de absorção no UV do cloxazolam na condição cromatográfica ótima de separação em duas dimensões (A) e (B) cromatograma em 3D.

Como pode ser observado não há interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção do cloxazolam. A detecção em 244 nm justifica-se pela maior absorção nesta faixa do espectro. A pureza de pico para o cloxazolam foi maior que 0,99, valores próximos de 1 indicam que os picos estão puros^{91,108}.

4.5.2. Desenvolvimento e validação do método de determinação do teor de cloxazolam e impurezas em comprimidos.

4.5.2.1. Estudo de degradação

O estudo de degradação forçada foi realizado pela exposição do diluente, placebo, amostra de comprimido de cloxazolam 4 mg e padrão de alprazolam nas seguintes condições: degradação ácida ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$); degradação básica ($\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$); degradação oxidativa (H_2O_2 3%); temperatura ($70 \text{ }^\circ\text{C}/48$ horas) e luz⁸⁶⁻⁸⁹.

Os cromatogramas obtidos no estudo de degradação de cloxazolam em meio básico são apresentados na Figura 69, na qual são observados picos de impurezas próximos a 11 minutos, com intensidade considerável indicando que houve degradação do composto cloxazolam. No cromatograma do placebo e diluente não foram observados os picos de degradação.

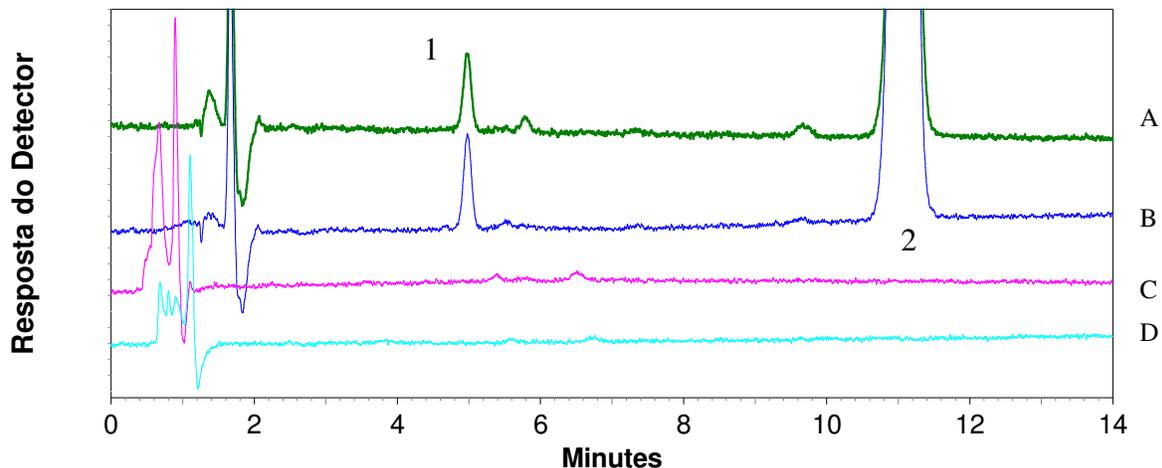


Figura 69 – Cromatogramas obtidos no estudo de degradação do cloxazolam em meio básico ($\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Condições cromatográficas: volume de injeção $5 \mu\text{L}$; coluna Si-C8-uréia $125 \times 3,9 \text{ mm FM ACN:TEA } 0,1\% \text{ pH } 7,0 \text{ } 50:50 \text{ v/v}$, vazão $1,0 \text{ mL/min}$; detecção UV a 244 nm e temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Cromatograma de A-padrão, B-amostra, C-placebo e D-diluyente. Compostos: 1- cloxazolam, 2- impureza.

Na Figura 70 são apresentados os espectros na região do ultravioleta para o cloxazolam do padrão e da amostra e também da impureza com retenção de 11 minutos. O fármaco cloxazolam apresenta máximo de absorção em 244 nm , Figura 68, e a impureza presente nas soluções degradadas de amostra e padrão apresenta máximo em 234 nm .

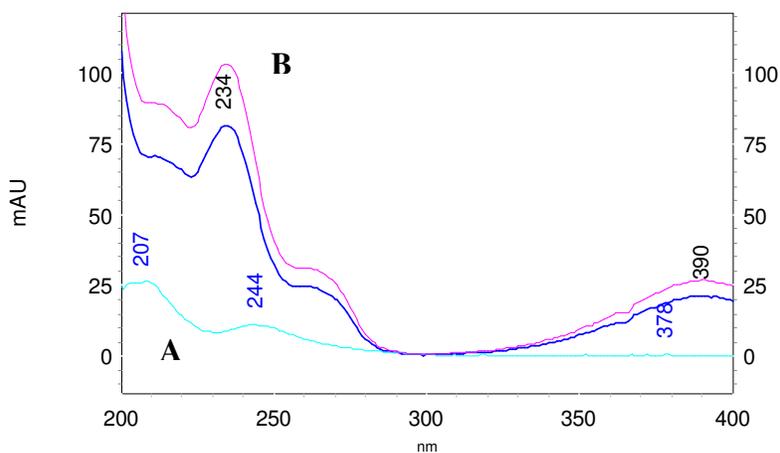


Figura 70 – Espectros de absorção no ultravioleta da amostra e padrão de cloxazolam em meio básico e padrão de cloxazolam em ACN. A-cloxacolam e B-impureza.

Os cromatogramas obtidos no estudo de degradação de cloxazolam em meio oxidativo estão apresentados na Figura 71, na qual são observados vários picos de impurezas, incluindo o pico em 11 minutos, visto também no cromatograma da degradação

básica. O aumento de impurezas indica que a degradação do composto cloxazolam é maior em meio oxidativo. No cromatograma do placebo e diluente não foram observados os picos de degradação.

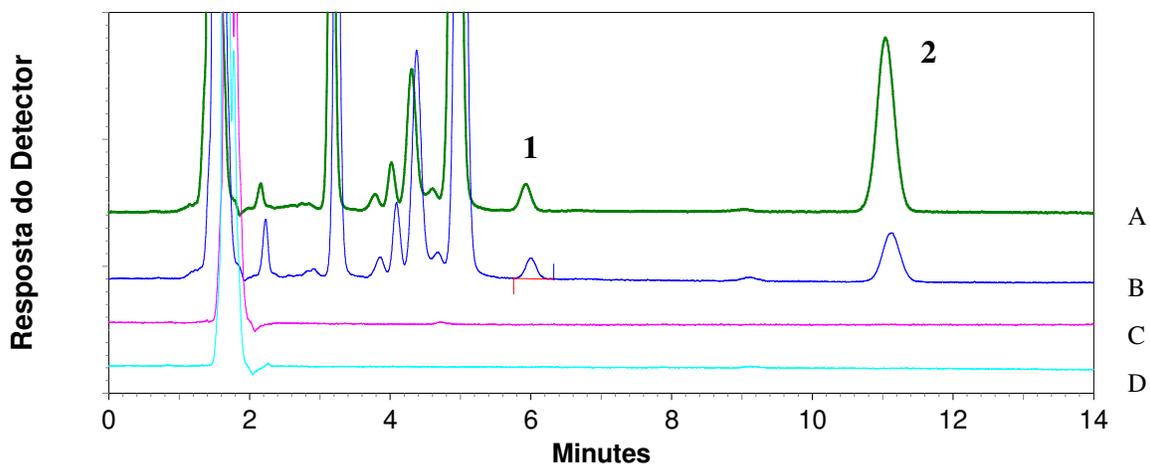


Figura 71 – Cromatogramas obtidos no estudo de degradação do Cloxazolam em meio oxidativo (H_2O_2 3,0%). Condições cromatográficas: volume de injeção 5 μ L; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50/50 v/v, vazão 1,0 mL/min; temperatura: 25 $^{\circ}$ C e detecção UV a 244 nm. Cromatograma de A-padrão, B-amostra, C-placebo e D-diluyente. Compostos: 1- cloxazolam, 2- impureza.

Nas Figuras 72 e 73 são apresentados os espectros dos compostos separados para a solução padrão degradada em meio oxidativo na região do ultravioleta.

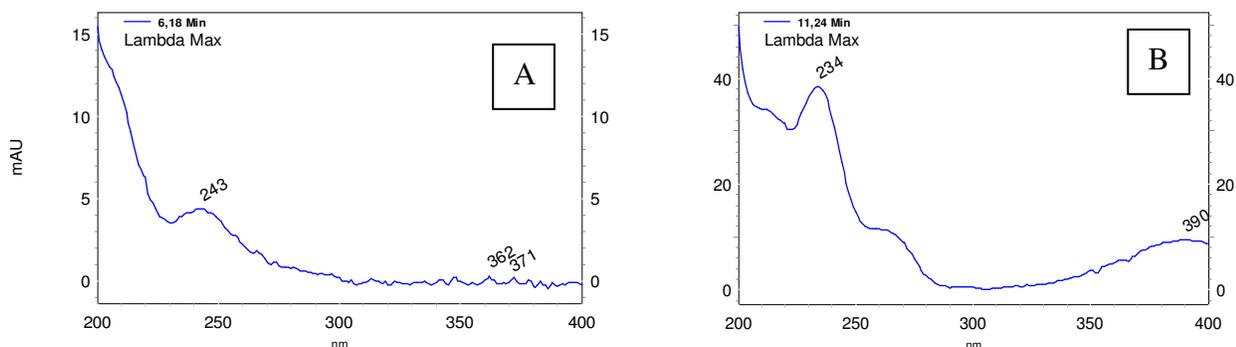


Figura 72 – Espectros de absorção no ultravioleta de padrão de cloxazolam em meio oxidativo, A cloxazolam e B impureza.

A impureza com retenção em 11,24 minutos apresenta máximo de absorção em 234 nm, sendo a mesma obtida na degradação básica. Os espectros das impurezas que

eluíram próximas a 4,53 e 5,15 minutos, Figura 73 A e B, respectivamente apresentaram máximo de absorção em 239 e 238 nm.

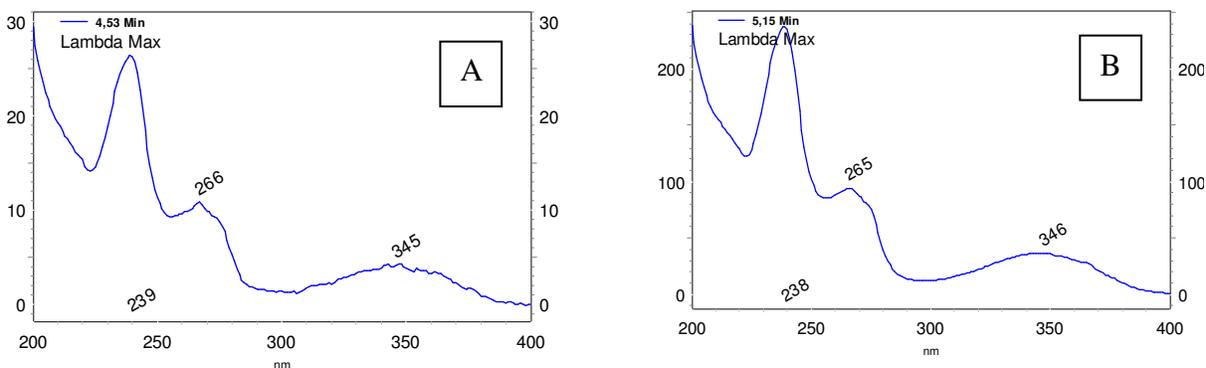


Figura 73 – Espectros de absorção no ultravioleta para impurezas de cloxazolam em meio oxidativo, A, B, impurezas.

Os cromatogramas obtidos no estudo de degradação de cloxazolam em meio ácido estão apresentados na Figura 74. A degradação observada na condição ácida também foi extensa, pois houve redução de área superior a 90% comparada à condição controle.

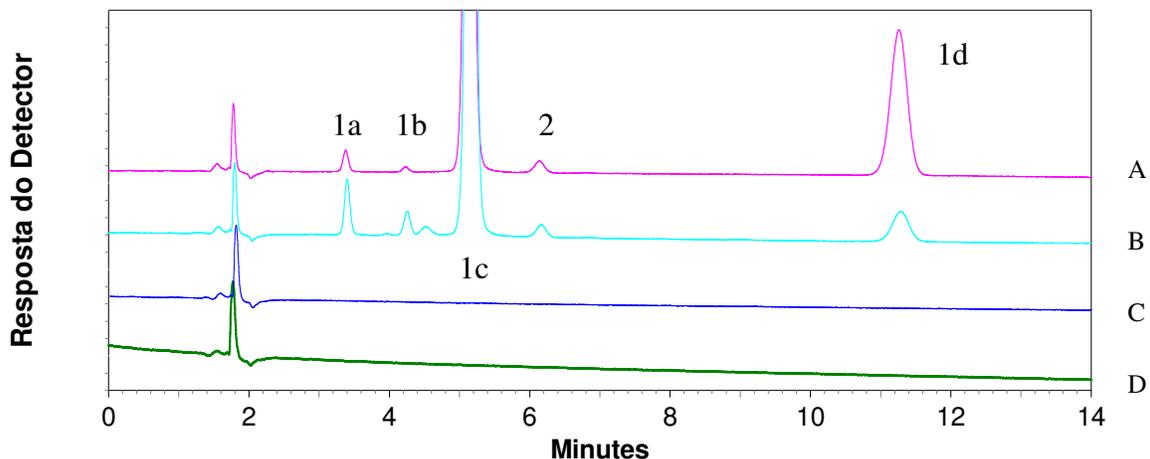


Figura 74 – Cromatogramas obtidos no estudo de degradação do Cloxazolam em meio ácido ($\text{Ácido HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Condições cromatográficas: volume de injeção $5 \mu\text{L}$; coluna Si-C8-uréia $125 \times 3,9 \text{ mm}$; FM: ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50/50 v/v, vazão $1,0 \text{ mL/min}$, temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e detecção UV a 244 nm . Cromatograma de A-padrão, B-amostra, C-placebo e D-diluyente. Compostos: 1- impurezas, 2- cloxazolam.

Na Figura 74 são visualizados vários picos de impurezas, incluindo o pico em 11 minutos observado também no cromatograma da degradação básica e oxidativa em 5,15

minutos. No cromatograma do placebo e diluente não foram observados os picos de degradação.

Na Figura 75 estão apresentados os espectros de absorção na região do ultravioleta dos compostos separados na solução padrão degradada em meio ácido. As impurezas com retenção em 4,2, 5,1 e 11,3 minutos também foram identificadas nos espectros, Figuras 75A, 75B e 75D, respectivamente. A Figura 75C apresenta o espectro de absorção para o cloxazolam obtido na separação em meio ácido.

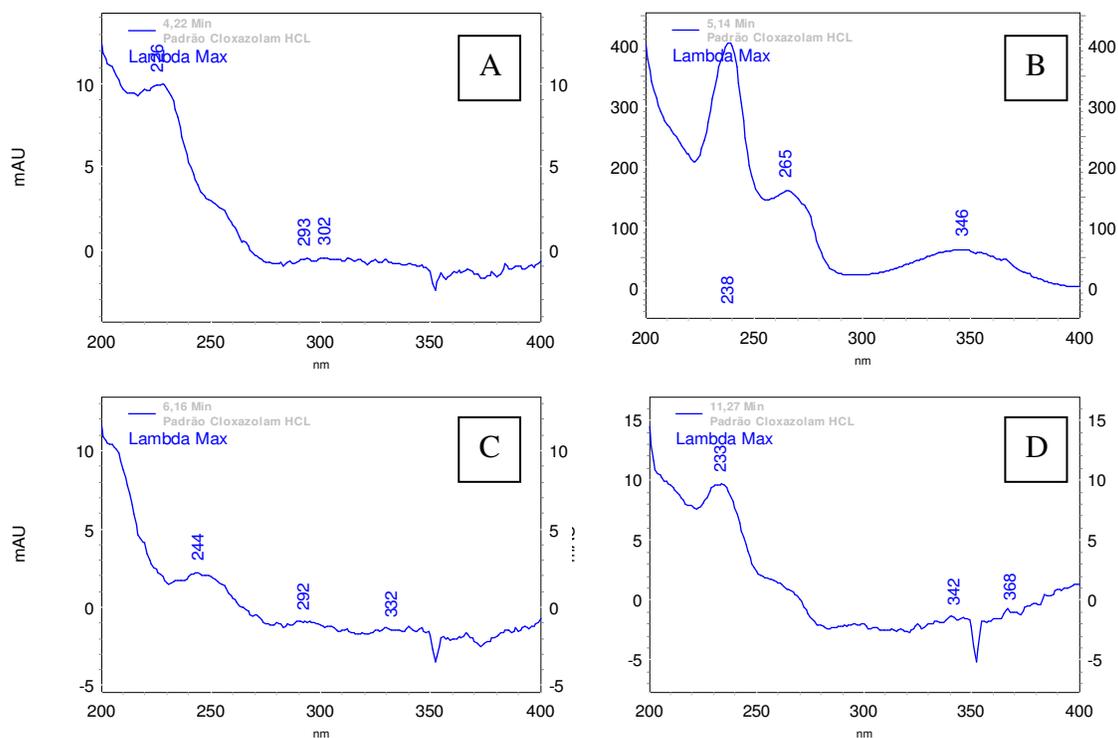


Figura 75 – Espectros de absorção no ultravioleta de padrão de cloxazolam em meio ácido. A, B, e D impurezas, C cloxazolam.

A fotólise para o cloxazolam, degradação em presença de luz UV a 254 nm, foi mais branda que as demais condições, apresentando baixa redução de área para o cloxazolam e a formação de apenas uma impureza. Na Figura 76 estão apresentados os cromatogramas obtidos sob condição de degradação fotolítica. Não foram observadas degradações provenientes do placebo e do diluente.

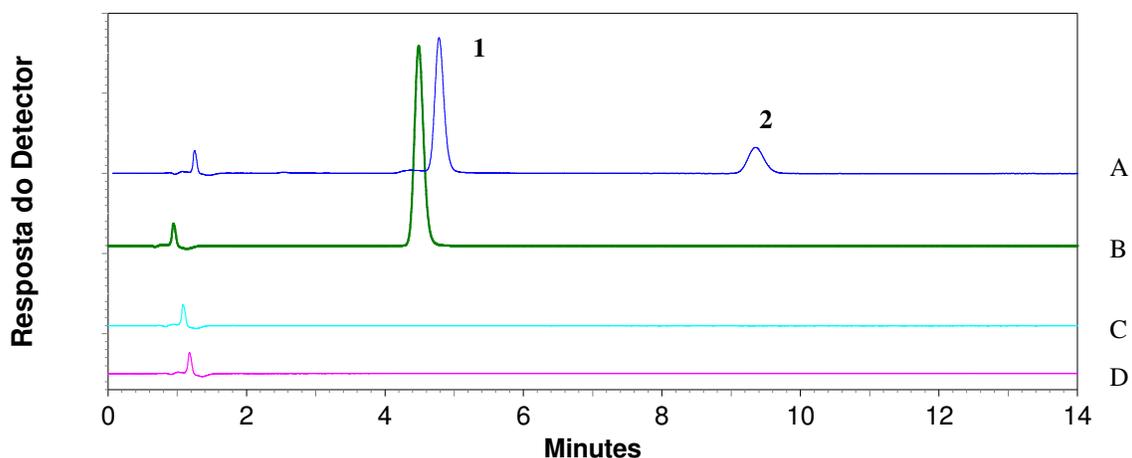


Figura 76 – Cromatogramas obtidos no estudo de degradação do cloxazolam em condições fotolíticas. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 μ L; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM: ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50/50 v/v, vazão 1,0 mL/min; temperatura: 25 °C e detecção UV a 244 nm. Cromatograma de A-padrão degradado, B-padrão controle, C-placebo e D-diluyente. Compostos: 1- cloxazolam, 2- impureza.

Na Figura 77 são apresentados os espectros de absorção na região do ultravioleta do cloxazolam e da impureza formada pela fólise obtidos com a solução amostra de cloxazolam.

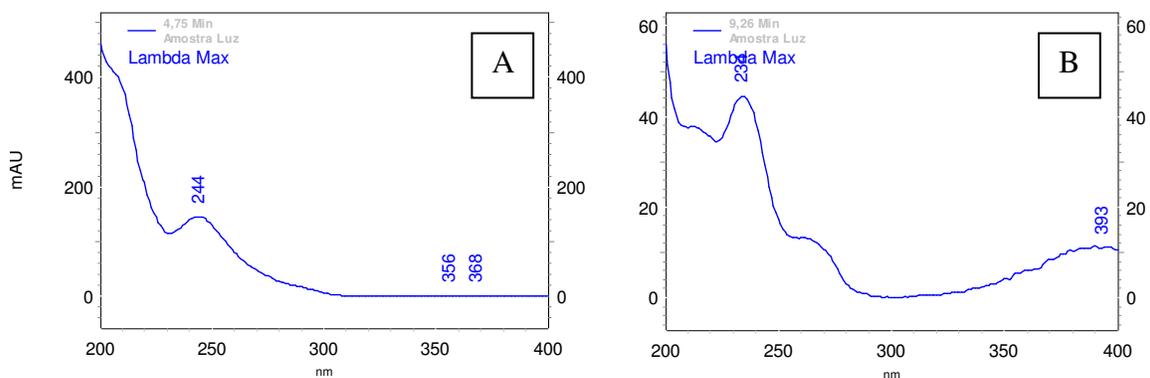


Figura 77 – Espectros de absorção no ultravioleta da amostra de cloxazolam exposto à luz. A-Cloxazolam e B-impureza.

Os cromatogramas obtidos no estudo da degradação de cloxazolam em temperatura de 60 °C estão apresentados na Figura 78. A degradação observada nesta condição foi branda comparada à condição básica e oxidativa. No cromatograma do placebo e do diluyente não foram observados os picos de degradação. O cloxazolam e a impureza apresentaram tempos de retenção menores em comparação às outras condições de degradação.

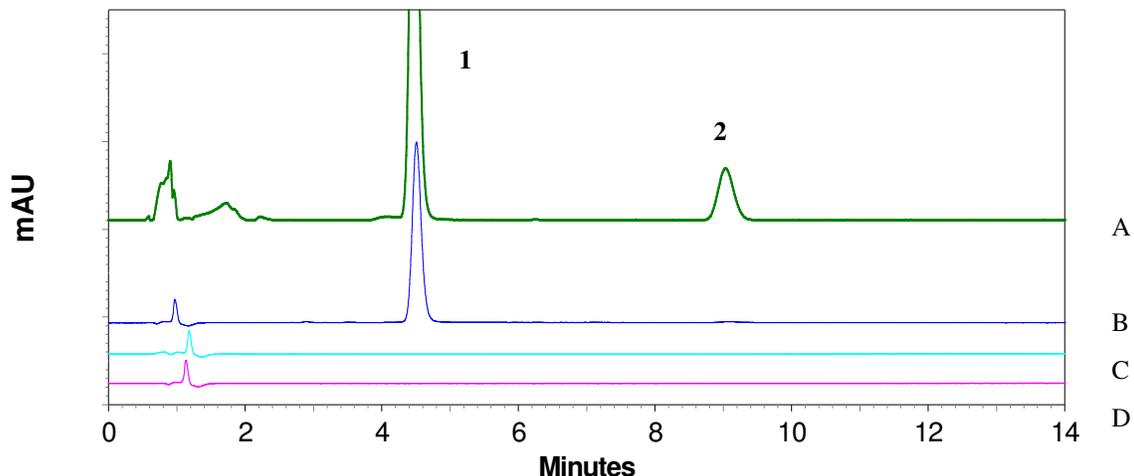


Figura 78 – Cromatogramas obtidos no estudo de degradação do cloxazolam em meio térmico. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 μ L; Coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50/50 v/v, vazão 1,0 mL/min; temperatura: 25 °C e detecção UV a 244 nm. Cromatograma de A-padrão degradado, B-padrão controle, C-placebo e D-diluyente. Compostos: 1- cloxazolam, 2- impureza.

Na Figura 79 estão apresentados os espectros de absorção no UV do cloxazolam e da impureza formada na degradação, sob temperatura. A impureza evidenciada pelo máximo de absorção em 234 nm eluiu em tempo de retenção inferior às demais condições de degradação.

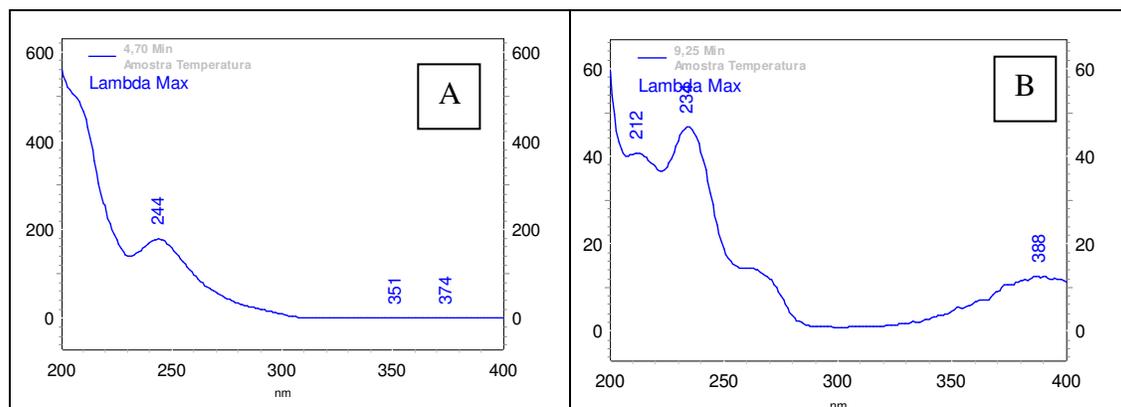


Figura 79 – Espectros de absorção no ultravioleta da amostra de cloxazolam exposta à temperatura. A-Cloxazolam e B-impureza.

Na Figura 80 estão apresentados os espectros de absorção no infravermelho dos padrões de cloxazolam em condição controle e expostos às condições de luz e

temperatura. Nos espectros não foram observadas diferenças significativas entre as bandas de absorção características dos grupos funcionais do fármaco.

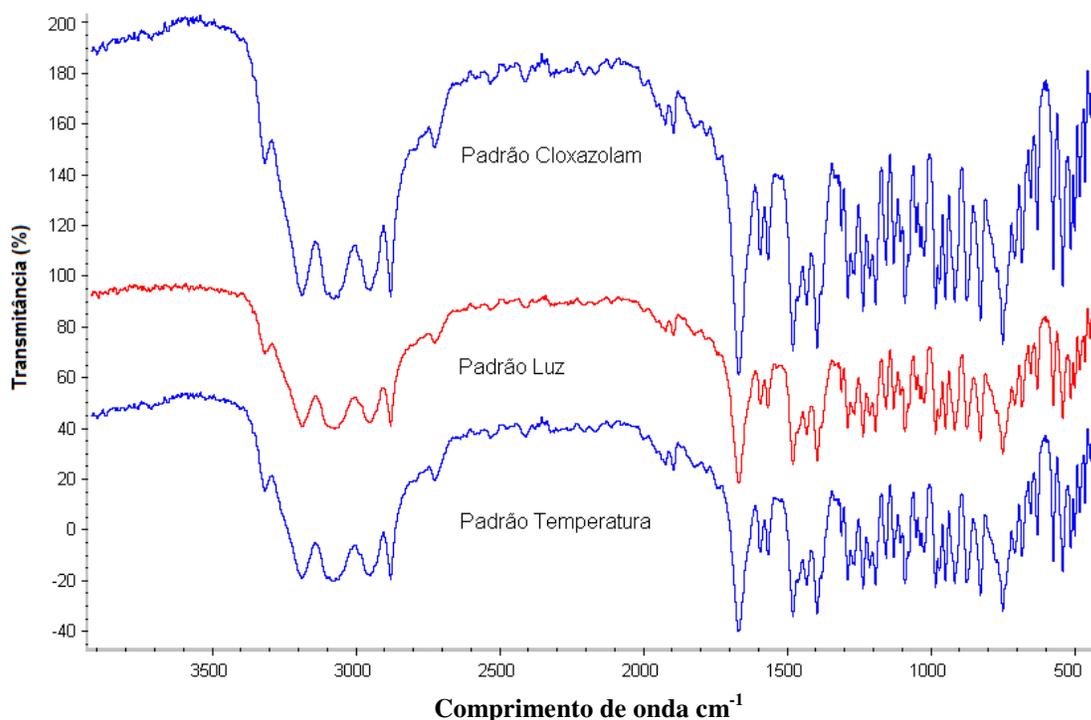


Figura 80 – Espectros de absorção no infravermelho do padrão de cloxazolam em estado sólido exposto à luz e temperatura.

Nas condições de degradação avaliadas, o espectro de cloxazolam apresentou as características principais inalteradas em comparação com o espectro apresentado na Farmacopéia Japonesa¹³⁹, mostrado na Figura 81.

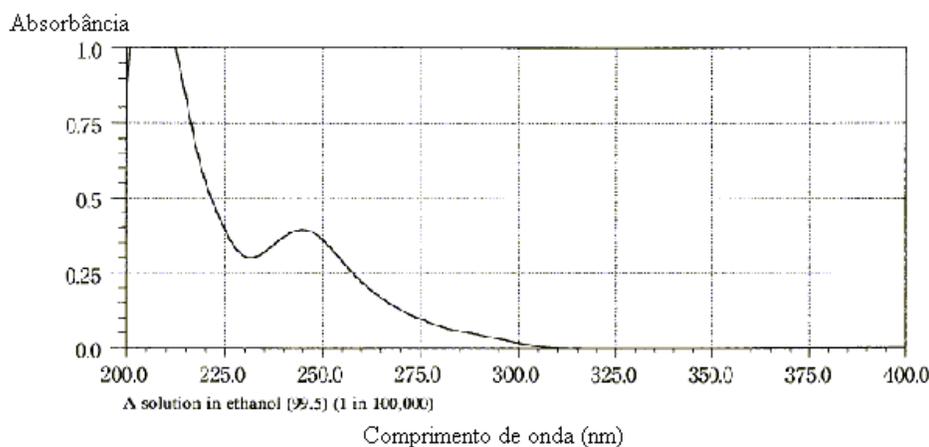


Figura 81 – Espectro de absorção ultravioleta do padrão de cloxazolam conforme Farmacopéia Japonesa (adaptado)¹³⁹.

4.5.3. Avaliação da estrutura química das impurezas de cloxazolam.

Para caracterizar as principais impurezas obtidas no estudo de degradação de cloxazolam, foi escolhida a condição em meio oxidativo. A partir da injeção no cromatógrafo a líquido acoplado ao espectrômetro de massas do padrão degradado em meio oxidativo, os principais picos de impureza foram avaliados isoladamente para verificação da massa molar e comparados aos resultados obtidos com uma solução contendo cloxazolam, impurezas propostas e compostos já identificados como as impurezas por detecção por arranjo de diodos. As informações obtidas com a espectrometria de massas acoplada ao cromatógrafo a líquido possibilitaram a identificação dos principais produtos de degradação. A Figura 82A apresenta o cromatograma dos padrões de impurezas cloxaetanolamina e benzofenona. A Figura 82B mostra o cromatograma do padrão de cloxazolam. Na Figura 83 pode ser visualizado o cromatograma da mistura dos padrões de cloxaetanolamina, benzofenona e cloxazolam.

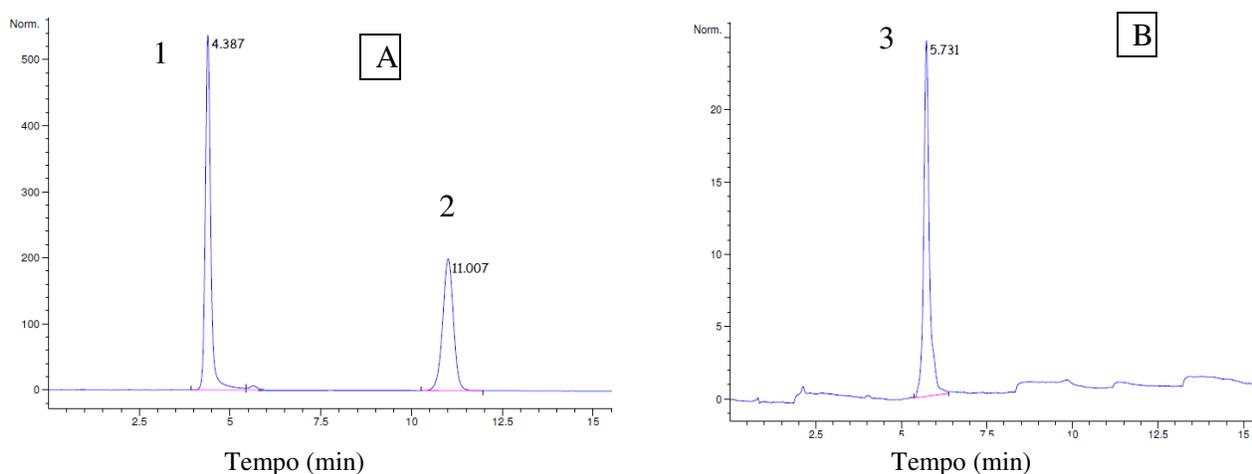


Figura 82 – Cromatogramas obtidos na separação de cloxazolam e padrão de impurezas por CLAE-DAD-EM. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 μ L; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm; FM: ACN:TEA 0,1% H 7,0 50/50 v/v, vazão 1,0 mL/min; temperatura 25 $^{\circ}$ C e detecção UV a 244 nm. Cromatograma: 1 – cloxaetanolamina, 2 – aminobenzofenona e 3 – cloxazolam. A) padrões cloxaetanolamina e benzofenona, B) cloxazolam.

Comparando o cromatograma da Figura 83 aos cromatogramas das condições de degradação, apresentados nas Figuras 69, 71, 73, 76 e 77, podem ser observadas semelhanças no tempo de retenção das impurezas e do cloxazolam.

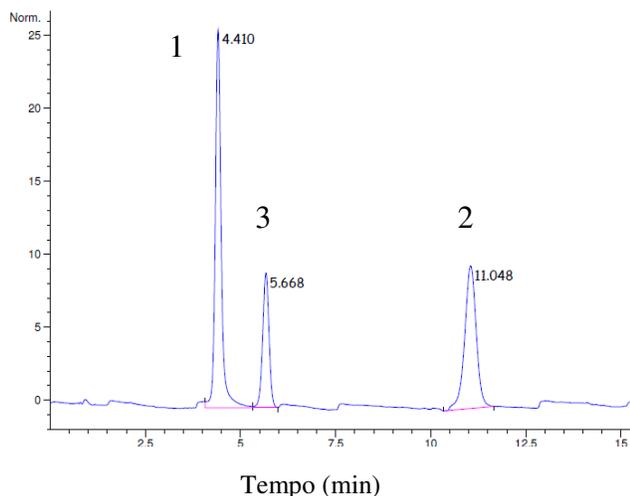


Figura 83 – Cromatograma obtido na separação da mistura de cloxazolam e impurezas por CLAE-DAD-EM. Condições cromatográficas: idênticas à Figura 82.

Na Figura 84 é apresentado o cromatograma de uma amostra de cloxazolam comprimidos com 18 meses de fabricação. Pode ser observada a presença da impureza em 4,3 minutos que comparada ao cromatograma da Figura 83, pode ser identificada como a cloxaetanolamina. A impureza também pode ser observada nos cromatogramas do estudo de degradação mostrados anteriormente.

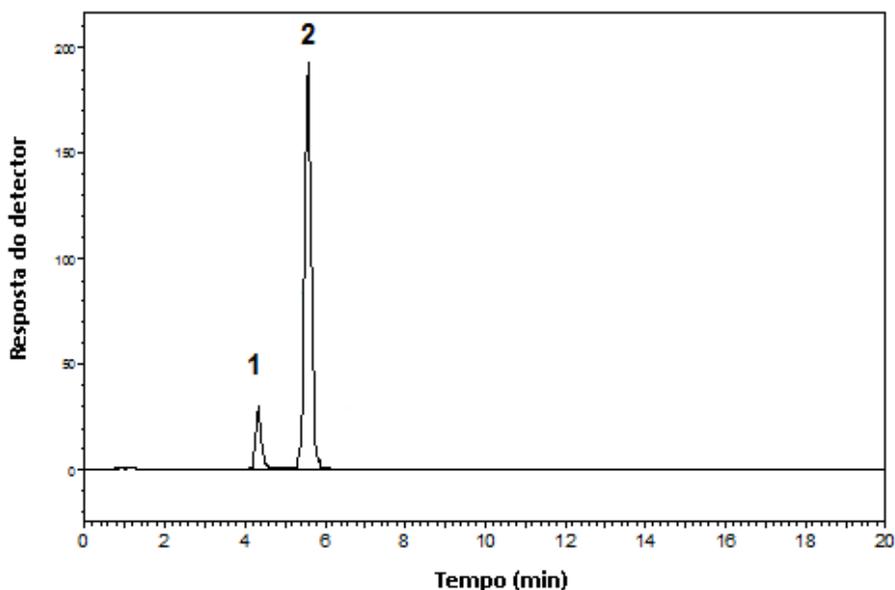


Figura 84 – Cromatograma obtido na separação de cloxazolam e impureza em comprimidos de cloxazolam com 18 meses de fabricação. Condições cromatográficas: volume de injeção 5 μ L; coluna Si-C8-uréia 125 x 3,9 mm FM: ACN:TEA 0,1% pH 7,0 50/50 v/v, vazão 1,0 mL/min; temperatura: 25 $^{\circ}$ C e detecção a 244 nm. Cromatograma: 1-cloxaetanolamina e 2-cloxazolam.

Na Figura 85 são apresentados os espectros de absorção no ultravioleta da impureza e cloxazolam em amostra de comprimido de cloxazolam analisada com a FE Si-C8-uréia.

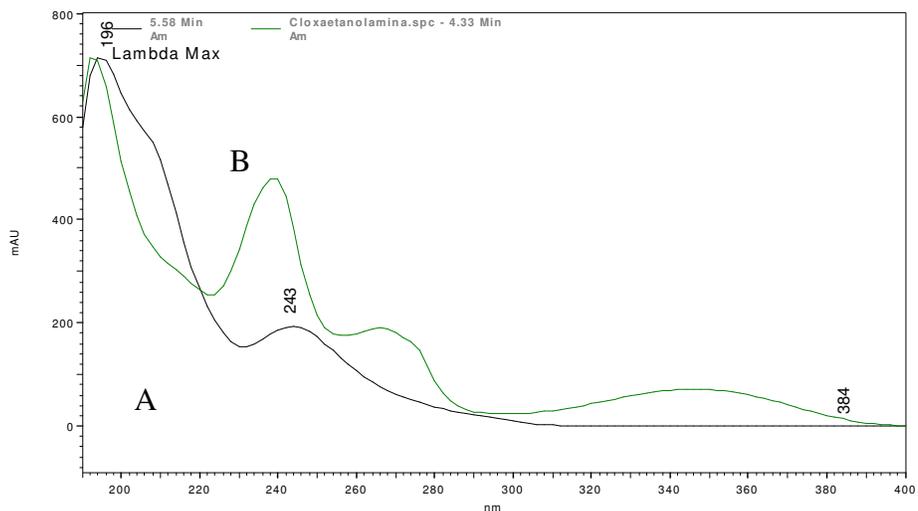


Figura 85 – Espectros de absorção no ultravioleta da amostra de comprimido de cloxazolam em 18 meses de estudo de estabilidade, A-Cloxazolam e B-impureza.

Para confirmação das impurezas de cloxazolam obtidas nos estudos de degradação e estabilidade foi feita a avaliação individual de cada pico cromatográfico para obtenção da razão massa/carga dos íons gerados. Na Figura 86 é apresentado o espectro de massas para o composto cloxazolam obtido com a solução de degradação em meio oxidativo. O íon em 349 m/z identifica o composto cloxazolam que possui massa molar de 348.

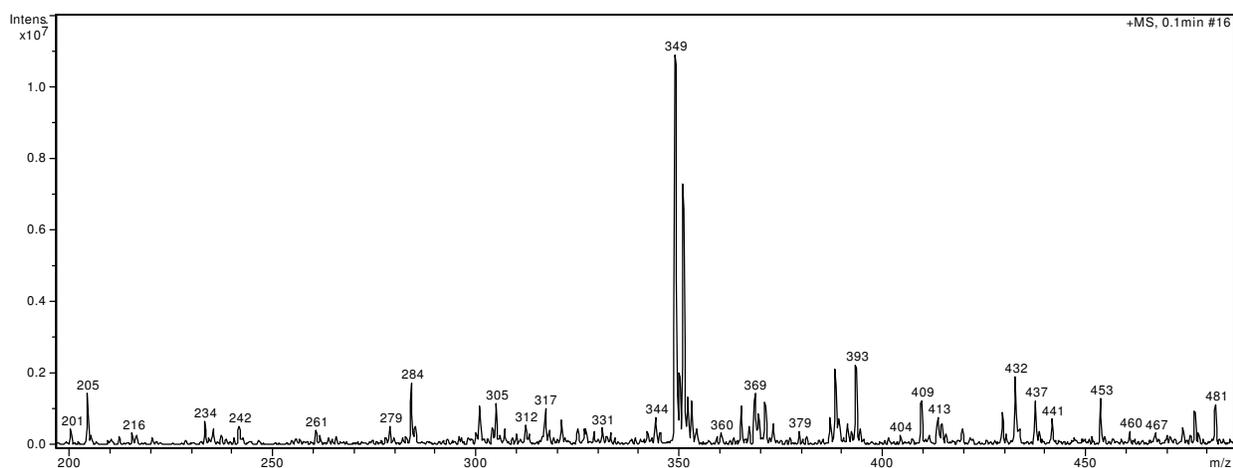


Figura 86 - Espectro de massas obtido para o pico de cloxazolam em ACN.

O íon de 349 m/z foi isolado e a fragmentação mostra o íon com massa de 305 m/z, Figura 87. Os resultados obtidos estão de acordo com o íon molecular avaliado por Miyaguchi *et al.*¹⁴⁵.

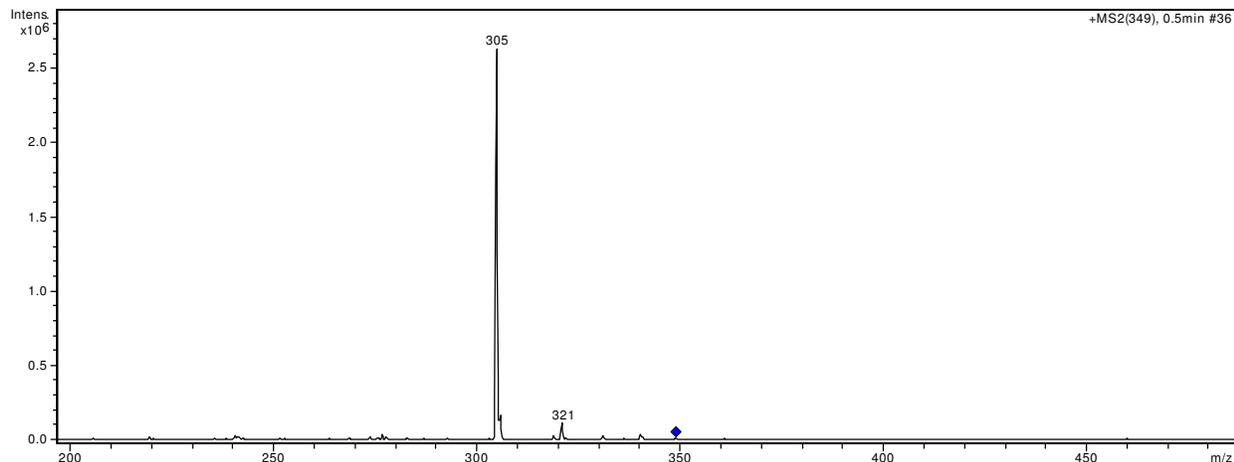


Figura 87 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM para o íon 349 m/z de cloxazolam em ACN.

Na Figura 88 é apresentado o espectro de massas e a estrutura química para a impureza do cloxazolam, identificada como cloxaetanolamina, 2-etanolaminoacetamida-2'-5-dicloro-benzofenona, massa molar 366 m/z.

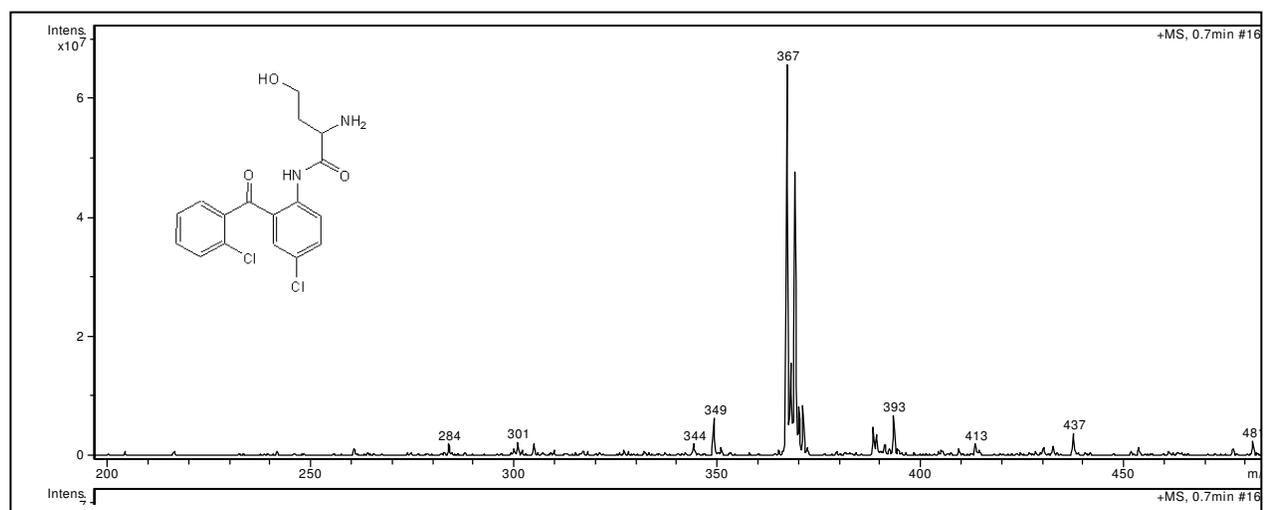


Figura 88 - Espectro de massas obtido para o pico de cloxaetanolamina em ACN.

O isolamento do íon 367 m/z gera como fragmentação um íon com 266 m/z de massa, Figura 89. Esse íon gerado está de acordo com a outra impureza sugerida para o cloxazolam, a aminobenzofenona.

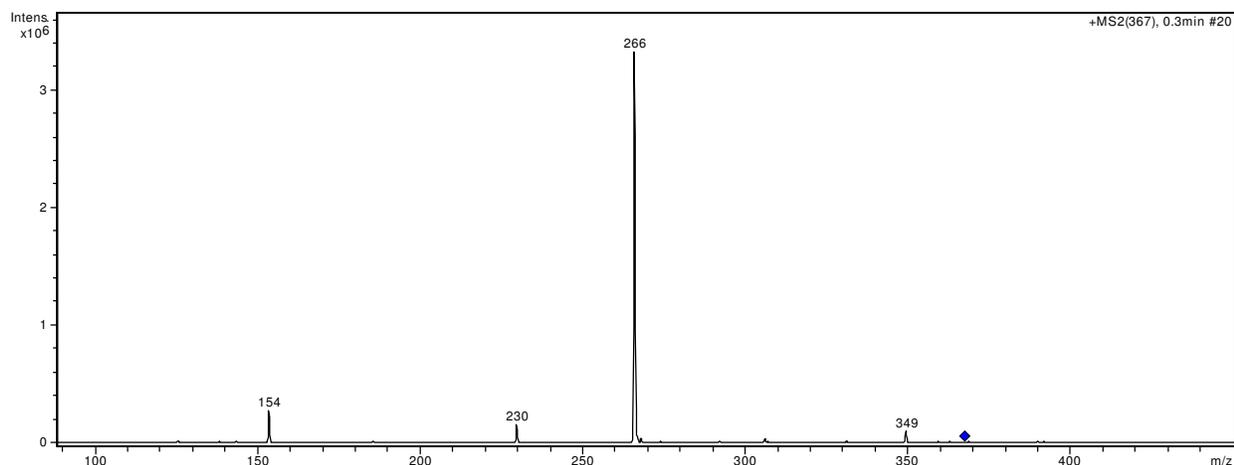


Figura 89 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM do íon m/z 367 de cloxaetanolamina em ACN.

Na Figura 90 é apresentado o espectro de massas e a estrutura para a outra principal impureza do cloxazolam, identificada como aminobenzofenona, 2-amino-2,5-dicloro-benzofenona, massa molar 265.

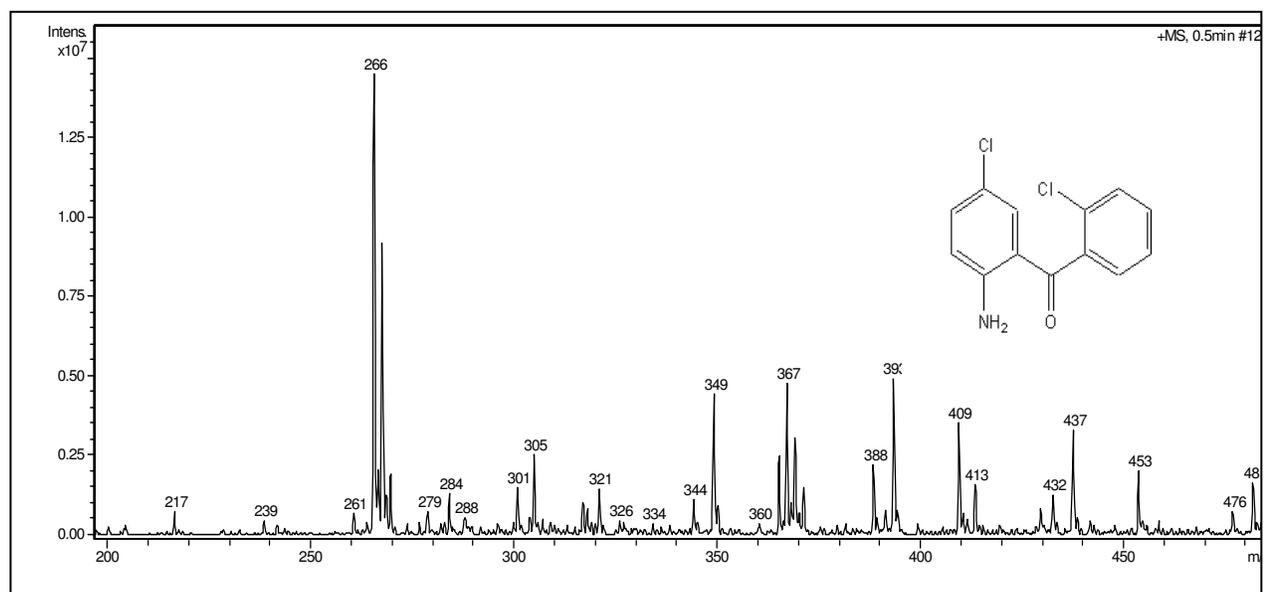


Figura 90 - Espectro de massas obtido para o pico de aminobenzofenona em ACN.

O íon m/z 266 foi isolado e a fragmentação mostra o íon com m/z de 230 e 154, apresentada na Figura 91.

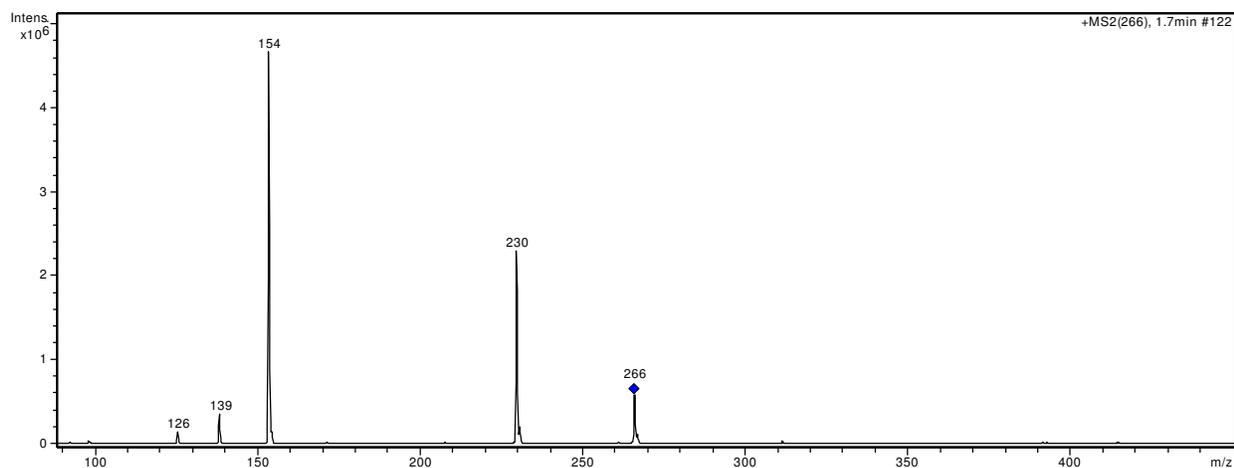


Figura 91 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM para o pico de aminobenzofenona em ACN.

Em condições de hidrólise o composto cloxazolam sofre degradação e produz a impureza cloxaetanolamina, como pode ser observado no espectro de massas para o cloxazolam em meio ACN:H₂O 50:50 v/v e gera também a impureza aminobenzofenona, como podem ser observados nos espectros de massas das Figuras 92 e 93.

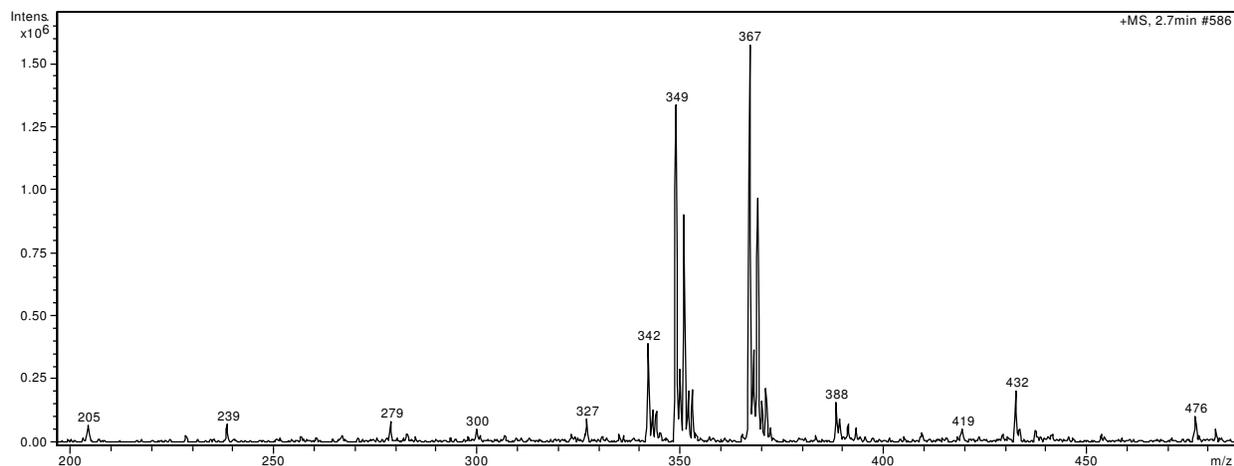


Figura 92 - Espectro de massas obtido por CL-EM para o pico de cloxazolam em ACN:H₂O 50:50 v/v.

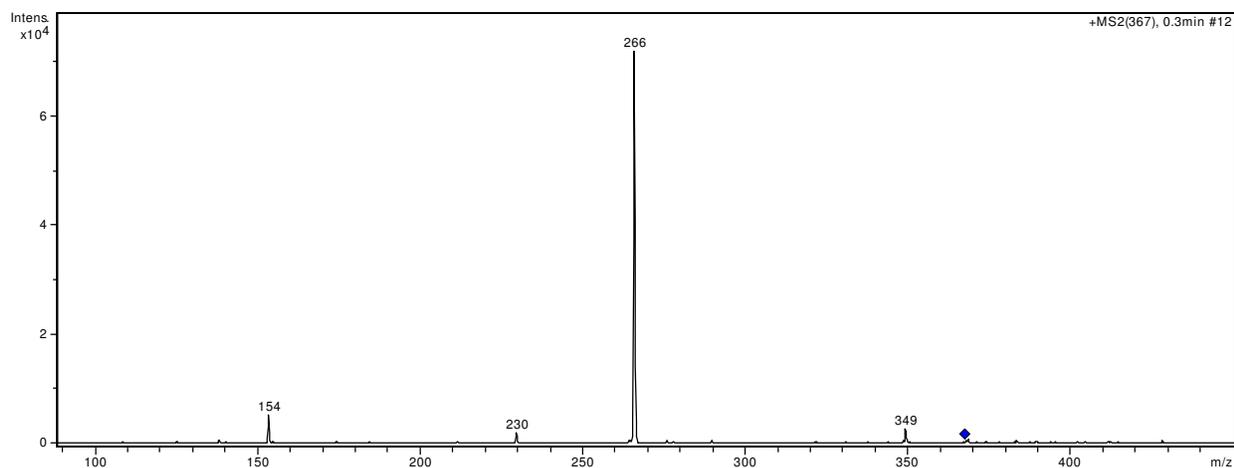


Figura 93 - Espectro de massas obtido por CL-EM/EM para o íon m/z 367 obtido a partir do pico de cloxazolam em ACN:H₂O 50:50 v/v.

Os resultados apresentados de separação cromatográfica, espectros de absorção no ultravioleta dos compostos e espectros de massas foram úteis na confirmação das impurezas presentes nas amostras de comprimido de cloxazolam e de matéria-prima.

4.5.4. Validação do método para determinação do teor de cloxazolam e impurezas

A partir da confirmação das impurezas cloxaetanolamina e aminobenzofenoa, foi realizada a validação do método analítico para determinação do teor de cloxazolam e impurezas em comprimidos de cloxazolam de 4 mg. A Tabela 37 apresenta os parâmetros cromatográficos obtidos na separação cromatográfica dos padrões das impurezas cloxaetanolamina e benzofenona e padrão de cloxazolam.

Tabela 37: Parâmetros cromatográficos obtidos na separação de cloxazolam e impurezas.

Composto	t_R (min)	k^*	N/m (m^{-1})	A_S	Pureza de Pico	Resolução
Cloxaetanolamina	4,4	2,6	32440	1,1	0,9989	-----
Cloxazolam	5,6	3,7	42027	1,0	0,9995	4,1
Aminobenzofenona	11,0	8,2	71334	1,2	0,9981	12,3

* t_M usado no cálculo do fator de retenção: 1,2

O método de análise para determinação de cloxazolam e impurezas foi validado segundo as normas da Resolução 899/03 da Anvisa⁷⁴ e dos guias do ICH Q2A⁷⁷ e Q2B⁷⁸ que são os principais para validação de métodos cromatográficos para determinação de fármacos. As figuras de mérito determinadas foram seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e estão apresentadas na Tabela 38.

Tabela 38: Figuras de mérito de validação do método na determinação de cloxazolam e impurezas.

Composto	Precisão		LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)	Exatidão (%)			Faixa Linear (µg mL ⁻¹)	Coeficiente de correlação (r)
	CV(%)	Repetibilidade /intermediária			10	100	120		
Cloxazolam	0,35	0,46	0,10	0,6	99,2	98,9	99,1	0,6-100	0,9999
Cloxaetanola mina	1,95	1,13	0,15	0,2	98,1	98,4	99,2	0,2-20	0,9998
Aminoben- zofenona	0,95	1,94	0,16	0,2	97,3	96,5	98,2	0,2-20	0,9997

A Figura 94 apresenta a curva analítica e o gráfico de resíduos obtidos na avaliação da linearidade.

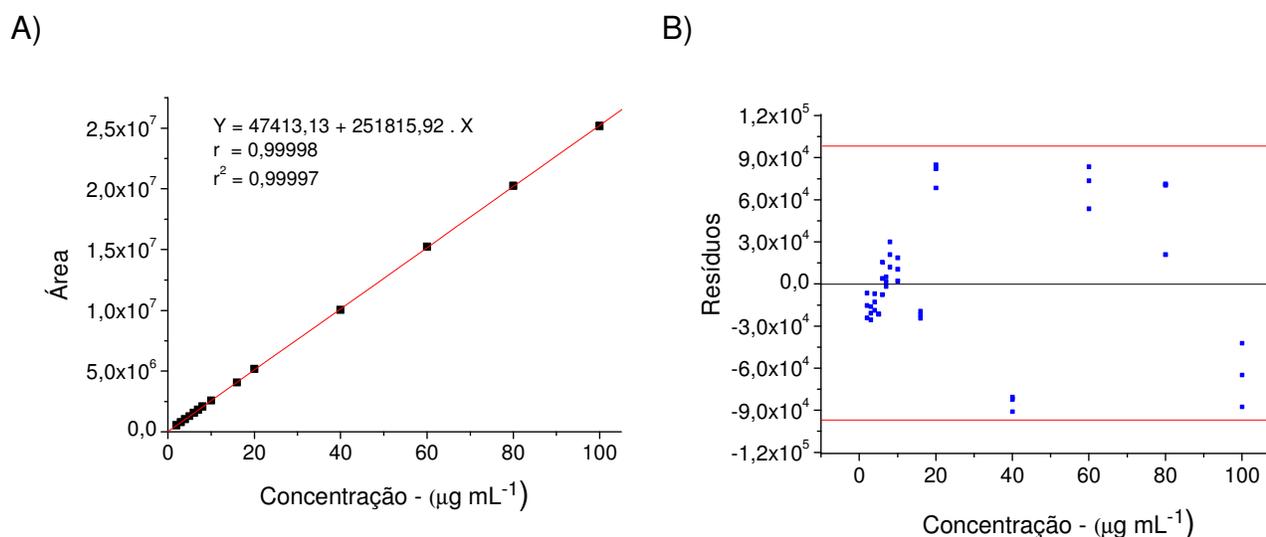


Figura 94 – Curva analítica (A) e gráfico de resíduos (B) do ajuste linear para o cloxazolam.

A distribuição dos resíduos do ajuste linear não apresentou tendência, mostrando dados aleatórios em torno do eixo zero. O método apresentou linearidade para as impurezas cloxaetanolamina e aminobenzofenona e para o cloxazolam, dentro da faixa de concentração avaliada.

Os valores de precisão para as impurezas e cloxazolam estão de acordo com a especificação descrita na Resolução 899 da Anvisa⁷⁴ que é de 2,0 % para a repetibilidade e de 5,0 % para a precisão intermediária. Os valores de $F_{\text{calculado}}$ obtidos foram de 1,8; 3,6 e 4,2 para cloxazolam, cloxaetanolamina e aminobenzofenona, respectivamente. Os resultados foram menores que o valor de F_{tabelado} de 5,05 ao nível de confiança de 95%, indicando que não há diferença significativa entre as duas precisões.

A exatidão foi avaliada ao nível de 10 %, 100 % e 120 % sobre uma concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cloxazolam e de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as impurezas a partir da adição das impurezas ao placebo do comprimido de cloxazolam. Os resultados de exatidão obtidos estiveram dentro de uma faixa de 97,3 % a 99,2 %, estando de acordo com a Anvisa⁷⁴.

Os valores para o limite de detecção foram determinados pelo método do sinal ruído, sendo que o limite de quantificação foi considerado como o primeiro ponto da faixa linear.

A Tabela 39 apresenta os resultados individuais para os valores de recuperação obtidos na avaliação do parâmetro robustez para cloxazolam.

Tabela 39: Parâmetros de robustez da validação do método na determinação de cloxazolam e impurezas.

Condição robustez	Recuperação (%)	CV %
Vazão $1,1 \text{ mL min}^{-1}$	99,4	0,5
Vazão $0,9 \text{ mL min}^{-1}$	99,2	0,6
Temperatura $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$	99,9	0,5
Temperatura $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$	99,6	0,4
FM 55/45 ACN-TEA 0,1% pH 7,0	99,0	0,5
FM 45/55 ACN-TEA 0.1% pH 7,0	99,5	0,4
Coluna Si-C8-uréia 150 x 3,9 mm	99,2	0,9
Sistema de CLAE	98,5	0,8

No estudo da robustez foram avaliadas as condições de alteração de vazão, proporção da FM, temperatura e sistema de CLAE. Os resultados para a robustez variaram de 98,5 % a 99,9 % em relação ao resultado do teor na condição original do método analítico.

O estudo de estabilidade foi realizado a partir de uma solução padrão e uma solução da amostra, preparadas conforme o método para a determinação de teor de impurezas. Injeções dessas soluções foram feitas a cada três horas durante um período de 72 horas para que fosse possível avaliar a alteração das áreas em cada período de tempo. O valor obtido de área foi calculado em termos percentuais da área obtida inicialmente. A Figura 95 apresenta o gráfico da estabilidade para o cloxazolam nas soluções padrão e amostra, onde foi possível observar um aumento na resposta relativa para o cloxazolam.

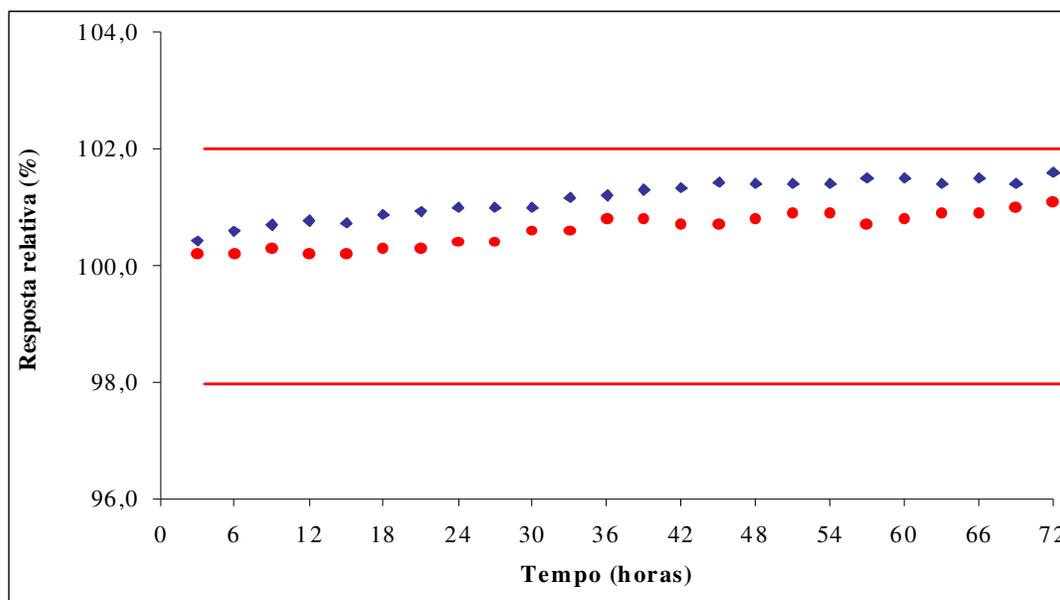


Figura 95 – Gráfico de estabilidade para cloxazolam nas soluções (▲) padrão e (●) amostra.

Após a validação do método foi realizada a análise de diferentes lotes cloxazolam comprimidos em diferentes períodos de validade, desde o tempo inicial até 18 meses de fabricação, para avaliar o teor de cloxazolam e a presença de impurezas, conforme apresentado na Tabela 40.

Tabela 40: Resultados do teor de cloxazolam e principais impurezas obtidas no estudo de estabilidade para cloxazolam comprimidos de 4 mg.

Composto	Teor (%) *			
	Inicial	6 meses	12 meses	18 meses
Cloxazolam	99,4	99,1	98,2	96,4
Cloxaetanolamina	0,2	0,5	0,9	1,6
Aminobenzofenona	0,0	0,1	0,2	0,3

* Análise em triplicata: estimativa de desvio padrão relativo < 0,5%

Os resultados para teor de cloxazolam em comprimidos de 4 mg apresentaram uma queda, devido possivelmente à formação de produtos de degradação e impurezas como a cloxaetanolamina e aminobenzofenona. No período de 18 meses avaliado houve redução de 3,0% no teor e aumento das impurezas, conforme mostrado na Figura 84 para a separação de cloxazolam em amostra de comprimidos com 18 meses de fabricação.

As condições cromatográficas de composição de FM, concentração de TEA e volume de injeção permitiram o desenvolvimento de um método analítico com parâmetros separação adequados para determinação de cloxazolam e impurezas. O método desenvolvido também possibilitou a separação dos produtos de degradação avaliados no teste de estresse da amostra e do padrão nas condições ácida, básica, oxidativa, fotolítica e temperatura. A partir da avaliação dos espectros de absorção no ultravioleta dos produtos de degradação e do cloxazolam foi possível observar que há impurezas comuns formadas nas condições de degradação. O uso da espectrometria de massas foi útil para comprovar que as impurezas originadas do teste de estresse são as mesmas que as obtidas no estudo de estabilidade do medicamento. Os espectros de massas permitiram a identificação e a confirmação da estrutura química das impurezas separadas através da comparação com os padrões de impurezas.

O método desenvolvido e validado usando a FE Si-C8-uréia mostrou-se simples, rápido e seletivo, podendo ser empregado na avaliação de cloxazolam e das impurezas cloxaetanolamina e aminobenzofenona em cloxazolam comprimidos e matéria-prima.

5. Conclusão

A FE Si-C8-uréia foi avaliada na separação de fármacos com características principalmente básicas, entre eles os benzodiazepínicos alprazolam e cloxazolam em formulações de comprimidos, succinato de doxilamina em xarope, estatinas em cápsulas gelatinosas e mistura de antiinflamatórios e fungicidas em creme. As separações obtidas para todos os compostos apresentaram parâmetros cromatográficos adequados e, em comparação com os métodos farmacopéicos, separações mais rápidas, com menor quantidade de modificador orgânico e redução de sais no preparo de tampões para FM.

Os métodos validados para determinação simultânea de estatinas em cápsulas e cloridrato de clobutinol e doxilamina em xarope são inovadores em comparação aos dos compêndios oficiais e estão em concordância com as recomendações da ANVISA⁷⁴ para as principais figuras de mérito.

Na separação de estatinas em cápsula foi obtida uma metodologia capaz de separar e quantificar as principais estatinas usadas em farmácias de manipulação, com seletividade adequada e mostrando potencial para uso investigativo.

O método para separação de cloridrato de clobutinol e doxilamina em xarope apresentou seletividade adequada na separação dos fármacos em meio aos excipientes do xarope e confirmou que a FE-SiC8-uréia apresenta baixa atividade silanofílica, pelos ótimos valores de fator de assimetria obtidos para a separação do composto básico succinato de doxilamina.

O estudo de degradação realizado para o método de alprazolam possibilitou a separação do alprazolam, dos principais produtos de degradação gerados sob as condições de estresse avaliadas e dos excipientes presentes nos comprimidos de alprazolam. Na validação da metodologia, os valores obtidos para as figuras de mérito estão de acordo com o preconizado pelas normas brasileiras⁷⁴, sendo o método adequado para separação de alprazolam e produtos de degradação.

O desenvolvimento do método para determinação de cloxazolam baseou-se no estudo da composição da FM e da otimização dos parâmetros cromatográficos. No estudo de degradação, foram identificadas as principais impurezas e produtos de degradação por CLAE-DAD/EM. O método para determinação de cloxazolam e as impurezas cloxaetanolamina e aminobenzofenona em comprimidos de cloxazolam foram validados e o mesmo aplicado na determinação de seu teor em amostras de comprimidos de

cloxazolam no estudo de estabilidade. Foi constatado que a amostra de cloxazolam com 18 meses de fabricação apresentou queda do teor e aumento do porcentual de impurezas no período avaliado. Os métodos desenvolvidos foram validados de acordo com a resolução 899 da ANVISA⁷⁴ e apresentam grande potencial como métodos para controle de qualidade dos medicamentos avaliados.

O potencial da FE Si-C8-uréia foi avaliado quanto ao uso em CLAE em fase reversa e apresenta características que permitem a sua aplicação na separação e determinação de fármacos, em especial os de caráter básico presentes em formulações farmacêuticas comuns. Nas separações destes compostos básicos foram obtidos excelentes valores de fator de assimetria comprovando a baixa atividade silanofílica da nova FE.

Capítulo VI

Conclusões

O método de preparação do novo agente sililante monofuncional forneceu uma nova FE contendo grupo polar do tipo uréia inserido na cadeia orgânica C8. Os resultados dos testes de caracterização por análise elementar, infravermelho, RMN ^{13}C , ^1H , ^{29}Si , confirmaram que o agente sililante foi preparado e imobilizado com sucesso na superfície da sílica.

A FE Si-C8-uréia mostrou-se eficiente na separação de misturas testes incluindo hidrocarbonetos aromáticos e várias classes de fármacos. Entre estes compostos, os fármacos básicos foram separados com melhor eficiência e simetria comparadas principalmente à fase C8 não capeada. A reação de capeamento da FE Si-C8-uréia permitiu uma menor interação dos compostos básicos presentes nas amostras com os silanóis residuais, que foram parcialmente bloqueados com a mistura de TMCS/HMDS. Os resultados obtidos para a separação de alguns compostos básicos, como a amitriptilina em diferentes misturas, comprovaram a baixa atividade silanofílica da FE.

A FE Si-C8-uréia mostrou-se seletiva na separação dos fármacos avaliados, presentes em diferentes matrizes farmacêuticas, como comprimidos, xaropes e cremes. Em alguns métodos desenvolvidos não foram utilizados tampões na preparação das FM, sendo uma vantagem frente aos métodos descritos nas farmacopéias que usam quantidades significativas de sais para o preparo da FM. No desenvolvimento de alguns métodos, foram utilizadas maior proporção aquosa em relação ao componente orgânico da FM, sendo isto vantajoso em relação às demais FE avaliadas. Algumas das separações obtidas com a nova FE foram mais rápidas quando comparadas as obtidas com a FE C8 comercial capeada e não capeada, permitindo uma economia no uso de FM, com menor custo de análise.

Dentre os métodos desenvolvidos alguns foram selecionados para serem validados de acordo com as especificações da ANVISA⁸⁰, tendo sido obtidos parâmetros aceitáveis em todos eles. No parâmetro seletividade foi comprovado que a coluna recheada com a nova FE foi capaz de separar os fármacos em meio aos excipientes contidos nas formulações.

As colunas utilizadas nesses métodos se mostraram estáveis durante toda a realização da validação. Os parâmetros cromatográficos obtidos no estudo de estabilidade da FE mostraram-se adequados até a passagem de 14500 mL de FM, comprovando o tempo de vida útil elevado da FE Si-C8-uréia.

A partir do teste de degradação para o composto cloxazolam foram estudadas as principais condições que originam as impurezas de degradação, através da separação utilizando a FE Si-C8-uréia. Com os resultados das análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foram identificadas individualmente as duas principais impurezas e comparadas aos padrões propostos para as impurezas.

Portanto, conclui-se que as colunas recheadas com a FE Si-C8-uréia podem ser usadas rotineiramente na determinação de diferentes classes de fármacos, em diversas formas farmacêuticas, obtendo separações com boa eficiência e picos simétricos, com menores tempos de retenção e com boa estabilidade química.

Capítulo VII

Referências Bibliográficas

- 1 H. A. Claessens, *Trends Anal. Chem.* 20, 2001, 563.
- 2 M. Bakshi, S. Singh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 2002, 1011.
- 3 U. D. Neue, J. E. O'Gara, A. Méndez, *J. Chromatogr. A* 1127, 2006, 161.
- 4 D. C. Harris, *Análise química quantitativa*, 7^a ed., LTC Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro 2007.
- 5 USP 32 - The United States Pharmacopeia, 32^a ed., United States Pharmacopeial convention, Rockville, 2009.
- 6 A. Stafiej, K. Pyrzynska, F. Regan, *J. Sep. Sci.* 30, 2007, 985.
- 7 D. I. Sora, V. Stefanescu, V. David, A. Medvedovici, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50, 2009, 459.
- 8 C. H. Collins, G. L. Braga, P. S. Bonato, *Fundamentos de cromatografia*, 4^a ed., Editora da Unicamp, Campinas, 2006.
- 9 R. Ciola, *Fundamentos de cromatografia a líquido de alto desempenho HPLC*, Editora Edgard Blücher, São Paulo, 2000.
- 10 C. R. Silva, I. C. S. F. Jardim, C. Airoidi, *J. Chromatogr. A* 987, 2003, 127.
- 11 R. B. Silva, C. R. Silva, C. Airoidi, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, *Microchem. J.* 82, 2006, 150.
- 12 J. Nawrocki, *J. Chromatogr.* 779, 1997, 29.
- 13 A. Berthod, *J. Chromatogr.* 549, 1991, 1.
- 14 A. M. Faria, *Desenvolvimento de FE para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa a partir da adsorção e imobilização do poli(metiltetradecilsiloxano) sobre sílica metalizada*, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2006.
- 15 L. T. Zhuravlev, *Colloids Surf. A* 173, 2000, 1.
- 16 I. Chappell, *LC-GC*, 20, 2002, 62.
- 17 R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, *Practical HPLC method development*, 2^a ed., Wiley, New York 1997.
- 18 U. Deschler, P. Kleinschmit, P. Panter, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 25, 1986, 236.
- 19 J. E. O'Gara, *LC-GC*, 19-6, 2001, 632.
- 20 T. L. Ascah, K. M. R. Kallury, C. A. Szafranski, S. D. Corman, F. Liu, *J. Liq. Chromatogr. Technol. Relat.* 19, 1996, 3049.

- 21 J. E. O'Gara, D. P. Walsh, B. A. Alden, P. Casellini, T. H. Walter. *Anal. Chem.* 71, 1999, 2992.
- 22 J. E. O'Gara, B.A.Alden, T. H. Walter, J. S. Petersen, C. L. Niederlander, U. D. Neue. *Anal. Chem.* 67, 1995, 3809.
- 23 C. R. Silva, *Preparação de novos agentes sililantes e suas aplicações na modificação de sílica gel cromatográfica*, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2002.
- 24 C. R. Silva, I. C. S. F. Jardim, C. Airoidi, *J. Chromatogr. A* 987, 2003, 139.
- 25 C. R. Silva, C. Airoidi, K. E. Collins, C. H. Collins, *J. Chromatogr. A* 1087, 2005, 29.
- 26 C. R. Silva, I. C. S. F. Jardim, C. Airoidi, *J. Chromatogr. A* 913, 2001, 65.
- 27 C. R. Silva, S. Bachmann, R. R. Schefer, K. Albert, I. C. S. F. Jardim, C. Airoidi, *J. Chromatogr. A* 948, 2002, 85.
- 28 C. R. Silva, C.H. Collins, I. C. S. F. Jardim, C. Airoidi, *J. Chromatogr. A* 1030, 2004, 157.
- 29 X. Liu, A. Bordunov, M. Tracy, R. Slingsby, N. Avdalovic, C. Pohl, *J. Chromatogr. A* 1119, 2006, 120.
- 30 X. Liu, A. Bordunov, C. Pohl, *J. Chromatogr. A* 1119, 2006, 128.
- 31 J. Layne, *J. Chromatogr. A* 957, 2002, 149.
- 32 N. S. Wilson, J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 1026, 2004, 91.
- 33 M. R. Euerby, P. Petersson, *J. Chromatogr. A* 1088, 2005, 1.
- 34 J. W. Coym, *J. Sep. Sci.* 31, 2008, 1712.
- 35 T. Hamada, H. Tanaka, H. Izumine, M. Ohira, *J. Chromatogr. A* 1043, 2004, 27.
- 36 X. Liu, C. A. Pohl, J. Weiss, *J. Chromatogr. A* 1118, 2006, 29.
- 37 J. L. Rafferty, J. I. Siepmann, M. R. Schure, *J. Chromatogr. A* 1216, 2009, 2320.
- 38 G. Zhi-Quiang, X. Dan, W. Quian-Hong, C. Lei, *Chin. J. Anal. Chem.* 37-2, 2009, 232.
- 39 C. A. Rimer, L. C. Sander, *Anal. Bional. Chem.* 349, 2009, 285.
- 40 L. Kallel, M. Ben Attia, K. Bouzouita, P. Assia, H. Trabelsi, *J. Sep. Sci.* 29, 2006, 929.
- 41 C. R. Silva, I. C. S. F. Jardim, C. H. Collins, C. Airoidi, *Quim. Nova*, 27-2, 2004, 270.
- 42 K. Albert, *J. Sep. Sci.* 26, 2003, 215.

- 43 S. Bachmann, L. F. C. Melo, R. B. Silva, T. A. Anazawa, I. C. S. F. Jardim, K. E. Collins, C. H. Collins, K. Albert, *Chem. Mater.* 13, 2001, 1874.
- 44 K. Albert, E. Bayer, *J. Chromatogr.* 544, 1991, 345.
- 45 J. Kiyokatsu, *J. Chromatogr. Sci.* 27, 1999, 729.
- 46 Perkin Elmer, User's manual elemental analysis, Norwalk: Perkin Elmer, 1996.
- 47 R. M. Silverstein, F. X. Webster, *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 6ª ed., LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 2000.
- 48 L. R. Snyder, J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2ª ed., John Wiley & Sons, New York, 1979
- 49 M. Ribani, C. B. G. Botolli, C. Collins, I. C. S. F. Jardim, L. F. C. Melo, *Quím. Nova* 27, 2004, 771.
- 50 United States Food and Drug Administration (US-FDA); Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation, 2000.
- 51 P. A. Swell, B. Clarke, *Chromatographic Separations*, John Wiley & Sons, New York, 1987.
- 52 H. Engelhardt, M. Jungheim, *Chromatographia* 29, 1990, 59.
- 53 K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, *J. Chromatogr. Sci.* 27, 1989, 721.
- 54 U. D. Neue, Ed Serowik, P. Iraneta, B. A. Alden, T. H. Walter, *J. Chromatogr. A* 849, 1999, 87.
- 55 British Pharmacopoeia, The Stationery Office – TSO, London, 2007, vol. I e II.
- 56 European Pharmacopoeia, Council of Europe, Strasbourg, France, VIth ed., monograph 04/2008.
- 57 R. E. Majors, *LC-GC*, 18, 2000, 1214.
- 58 D. A. Fonseca, “*Desenvolvimento de um novo procedimento de avaliação da estabilidade de FE para cromatografia líquida de alta eficiência*” Dissertação de mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2001.
- 59 <http://www.progenericos.org.br/mercado.shtml>; acessado em 15/10/2010.
- 60 <http://pfarma.com.br/noticias-farmaceuticas/918-industria-farmaceutica/275-mercado-farmaceutico-deve-movimentar-em-2010-us-830-bi.html>; acessado em 15/10/2010.

- 61 <http://www.progenericos.org.br/infomercado.shtml>; acessado em 15/10/2010.
- 62 http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/estatistica/8_sumariogeral.pdf; acessado em 15/10/2010.
- 63 <http://funcapciencia.funcap.ce.gov.br/noticias/industria-farmaceutica-brasileira-e-a- crise-mundial>; acessado em 15/10/2010.
- 64 B. E. O. Markman, M. R. W. Koschtschak, P. S. C. de Souza, P. C. P. Rosa, *Avaliação da Conformidade Farmacopeica de Cápsulas de Sinvastatina Manipuladas em Farmácias de São Paulo e Campinas*. Trabalho apresentado no XV Congresso Brasileiro de Farmácia, São Paulo, 2007.
- 65 F. M. Lanças, *Scientia Chromatographica* 1, 2009, 35.
- 66 Farmacopéia Brasileira, 4ª ed., Atheneu, São Paulo, 1988.
- 67 Apostila Seminário Cromatografia Waters /Agilent, 2009.
- 68 S. V. Gandhi, N. D. Dhavale, V. Y. Jadhav, S. S. Sabnis, *J AOAC Int.* 91, 2008, 33.
- 69 A. J. dos Santos Neto, *Scientia Chromatographica* 1- 3, 2009, 69.
- 70 A. J. dos Santos Neto, *Scientia Chromatographica* 2- 1, 2010, 71.
- 71 I. C. S. F. Jardim, *Scientia Chromatographica* 2- 1, 2010, 13.
- 72 F. Leite, *Scientia Chromatographica* 1- 2, 2009, 63.
- 73 F. Leite, *Validação em Análise Química*, 3ª Ed. Editora Átomo, Campinas, 2007.
- 74 ANVISA. Resolução RE Nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos, 2003.
- 75 Apostila Curso - Validação de Métodos Analíticos – CEP Cursos - 2009
- 76 ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Guia para Qualidade em Química Analítica*, Série Acreditação 1, Volume 1, Abril, 2004.
- 77 ICH Q2A, International Conference on Harmonization; *Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology*, (CPMP/ICH/381/95), 1995.
- 78 ICH Q2B, International Conference on Harmonization; *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, (CPMP/ICH/281/95), 1995.
- 79 Guia INMETRO - *Orientação sobre validação de ensaios químicos*, DOQ-CGCRE-008, de março/2003.
- 80 ANVISA, Resolução – RE Nº 310, de 1º de Setembro de 2004.
- 81 ANVISA, RDC 31, de 11 de Agosto de 2010.

- 82** P. C. P. Rosa, I. C. S. F. Jardim, *Validação de Método Cromatográfico Indicador de Estabilidade para Determinação de Alprazolam em Comprimido*, trabalho apresentado na XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, 2007
- 83** P. C .P. Rosa, C. R. Silva, C. Airoidi, I. C. S. F. Jardim, *Determination of cloxazolam in tablets by hplc-rp using a new C8 stationary phase containing embedded urea groups*, trabalho apresentado no CIFARP 2007, 6º International Congress of Pharmaceutical Sciences, Riberão Preto-SP, 2007.
- 84** J. A. Gilliard, C. Ritter, *J. Chromatogr. A* 786, 1997, 1.
- 85** ANVISA, Informe Técnico Nº 1, de 15 de Julho de 2008.
- 86** International Conference on Harmonization (ICH); *Validation of Analytical Procedures: Impurities in New Drugs Products*, Q3B(R2), 2006.
- 87** A. I. H. Adams, *Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade do voriconazol*, Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- 88** M. Bakshi, S. Singh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 2002, 1011.
- 89** N. Kaul, H. Agrawal, A. Kadad, S.R. Dhaneshwar, B. Patil, *Anal. Chim. Acta* 536, 2005, 49.
- 90** Miller J.C., Miller J.N. – *Statistics for Analytical Chemistry*, 3ª ed., Ellis Horwood PTR Prentice Hall, New York, 1993.
- 91** C. A. Burtis, E. R. Ashwood, D. E. Bruns, *TIETZ Fundamentos de Química Clínica*, 6ª ed., Elsevier Editora Ltda, Rio de Janeiro, 2008.
- 92** Apostila U.S. Pharmacopeia, Workshop XI - Practical Applications of USP and Related Statistical Tests, Barueri, 2010.
- 93** D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed., Bookman Companhia Editora, Porto Alegre, 2002.
- 94** J. Mendham, R.C. Denney, J.D. Barnes, M.J.K. Thomas, Vogel – *Análise Química Quantitativa*, 6ª ed., Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 2002.
- 95** C. Airoidi, C.R. Silva, I.C.S.F. Jardim, *Novas FE para cromatografia líquida, contendo grupos polares do tipo uréia inseridos na cadeia N-alquila, para a separação e a purificação de compostos básicos.* –FAPESP PI 0300590-9, 2003.

- 96 M. T. Matyska, J. J. Pesek, R. Suryadevara, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28, 2005, 2111.
- 97 J. Horak, W. Lindner, *J. Chromatogr. A* 1043, 2004, 177.
- 98 H. Engelhardt, P. Orth, *J. Liq. Chromatogr.* 10, 1987, 1999.
- 99 V. R. Meyer, *Practical high-performance liquid chromatography*, 2^a ed., Wiley, New York, 1996.
- 100 D. L. Paiva, G. M. Lampman G. S. Kriz, *Introduction to Spectroscopy*, 2^a ed., Saunders College Publishing, New York, 1996.
- 101 U. D. Neue, Y. F. Cheng, B. A. Alden, P. C. Iraneta, C. H. Phoebe, K. van Tran, *Chromatografia* 54, 2001, 169.
- 102 Catálogo Merck Chrombook 2008-2009, 121.
- 103 X. W. Teng, K. Foe, K. F. Brown, D. J. Cutler, N. M. Davies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26, 2001, 313.
- 104 S. Shaikh, M. S. Muneera, O. A. Thusleem, M. Tahir, A. V. Kondaguli, *J. Chromatogr. Science*, 47, 2009, 178.
- 105 M. A. Oliveira, E. M. Lima, *Desenvolvimento e validação de metodologia por CLAE para determinação de metilparabeno e propilparabeno em cápsulas gelatinosas duras e transparentes*, trabalho apresentado no 48^o CBQ – Congresso Brasileiro de Química, Rio de Janeiro, 2008.
- 106 <http://www.folheto.net/bisolgrip-t-acido-acetilsalicilico-paracetamol-cafeina-bula-do-medicamento/>; acessado em 15/09/2010.
- 107 P. C. P. Rosa, A. M. Faria, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, *Avaliação da separação cromatográfica de fármacos empregando novos tipos de FE reversas para CLAE*, trabalho apresentado no 47^o CBQ – Congresso Brasileiro de Química, Salvador, 2006.
- 108 <http://www.bulas.med.br>; acessado em 15/09/2010.
- 109 O. M. Abdallah, *International Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 5.
- 110 Y. Tang, L. Zhao, Y. Wang, J. P. Fawcett, J. Gu, *J. Chromatogr. B* 819, 2005, 185.
- 111 A. El-Gindy, A. Mostafa, *Fármaco* 60, 2005, 269.
- 112 A. A. Elshanawane, S. M. Mostafa, M. S. Elgawish, *J. AOAC Int.* 92, 2009, 404.
- 113 M. N Uddin, V. F. Samanidou, I. N. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.* 31, 2008, 3704.

- 114 Goodman, Louis S.; Gilman, Alfred. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 10^a ed., McGraw-Hill, Rio de Janeiro, 2007.
- 115 MARTINDALE -*The Extra Pharmacopoeia*, 31st ed., Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London, 1996.
- 116 M. Rizk, F. Bela, F. Ibrahim, S. HMED, Z. A. Sheribah, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27, 2002, 813.
- 117 C. N. Saha, S. Bhattacharya, *Int. J. Chem. Tech. Res* 1, 2009, 671.
- 118 P. C. P. Rosa, I. C. S. F. Jardim, *Determinação de valerato de betametasona, tolnaftato e clioquinol em creme e pomada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa*, trabalho apresentado no XV Congresso Brasileiro de Farmácia, São Paulo, 2007.
- 119 B. E. O. Markman, M. R. W. Koschtschak, P. C. P. Rosa, *Assessment of quality of simvastatin capsules from pharmacies of Sao Paulo and Campinas - Brazil*, *Rev. Saúde Pública* 2010, artigo submetido.
- 120 L. Novákova, D. Satínský, P. Solich, *TrAC Trends Anal. Chem.* 27, 2008, 352.
- 121 M. Hefnawy, M. Al-Omar, S. Julkhuf, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50, 2009, 527.
- 122 M. K. Pasha, S. Muzeeb, S. J. Basha, D. Shashikumar, R. Mullangi, N. R. Srinivas, *Biomed Chromatogr.* 20, 2006, 282.
- 123 A. Ishi, H. Seno, T. Kumazawa, O. Suzuki, *Hochudohu* 11, 1993, 176.
- 124 E. T. Malliou, C. G. Antouniou, J. E. Koundourellis, *Anal. Lett.* 35, 2002, 99.
- 125 E. T. Malliou, C. K. Markapoulou, J. E. Koundourellis, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27-10, 2004, 1565.
- 126 Y.M. Issa, S.I.M. Zayed, *Talanta* 69, 2006, 481.
- 127 L. Monferrer-Pons, J. Esteve-Romero, G. Ramis-Ramos, M. C. Garcia-Alvarez-Coque, J. Esteve-Romer, *Anal. Lett.* 29, 1996, 1399.
- 128 G. J. Indrayanto, *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 9, 1996, 282.
- 129 G. W. Fong, W.M. Eickhoff, *Int. J. Pharm.* 53, 1989, 91.
- 130 A. P. Argekar, J. G. Sawant, *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 25-8, 1999, 945.
- 131 M. Gil-Augusti, M. E. Capella-Peiró L. Monferrer-Pons, M. C. Garcia-Alvarez-Coque, J. Esteve-Romero, *Analyst* 126, 2001, 457.

- 132 P. C. P. Rosa, I. C. S. F. Jardim, *Determinação simultânea de cloridrato de clobutinol e succinato de doxilamina em produtos farmacêuticos por CLAE-FR*, trabalho apresentado no XV Congresso Brasileiro de Farmácia, São Paulo, 2007.
- 133 P. P. Lozano, E. G. Montoya, A. Orriols, M. Miñarro, J. R. Ticó, J. M. Suñé-Negre, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34, 2004, 979.
- 134 N. S. Nudelman, C. G. Carrera, *J. Pharm. Sci.* 91, 2002, 1274.
- 135 A. L. Huidobro, F. J. Rupérez, C. Barbas, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 2007, 404.
- 136 A. Pathak, S. J. Rajput, *J. AOAC Int.* 91, 2008, 1344.
- 137 M. Ito, T. Miyajima, T. Fujui, T. Okuno, *Pediatric Neurology* 30-2, 2004, 111.
- 138 Portaria SVS/MS 344 de 12/05/2008.
- 139 Farmacopeia Japonesa, XIV Ed. 2001.
- 140 F. J. Rodrigues, R. M. Jiménez, R. M. Alonso, *Fresenius Z Anal. Chem.* 334, 1989, 158.
- 141 H. Maurer, K. Pflieger, *J. Chromatogr.* 422, 1987, 85.
- 142 H. Inoue, Y. Maeno, M. Iwasa, R. Matoba, M. Nagao, *Forensic Sci. Int.* 113, 2000, 367.
- 143 F. J. Rodríguez, R. M. Jiménez, R. M. Alonso, *J. Chromatogr.* 578, 1992, 146.
- 144 M. Laloup, M. R. Fernandez, G. D. Boeck, M. Wood, V. Maes, *J. Anal. Toxicol.* 29, 2005, 616.
- 145 H. Miyaguchi, K. Kuwayama, K. Tsujikawa, T. Kanamori, Y. T. Iwata, H. Inoue, T. Kishi, *Forensic Sci. Int.* 157, 2006, 57.
- 146 K. Otsubo, H. Seto, K. Futagami, R. Oishi, *J. Chromatogr. B* 669, 1995, 408.
- 147 K. Jinno, H. Sawada, A. P. Cataby, H. Watanabe, N. B. H. Sabli, J. J. Pesek, M. T. Matyska, *J. Chromatogr. A* 887, 2000, 479.
- 148 Y. Suzuki, H. Arakawa, M. Maeda, *Biomed. Chromatogr.* 18, 2004, 150.
- 149 Hypersil™ GOLD HPLC Columns Technical Guide, volume 2, disponível em <http://www.interscience.be/promotiesites/hypersil/topics/promotiesites/hypersil/lcms2/hypergold2.pdf>; acessado em 20/10/2010.