

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

MAICON DE MORAIS

**Estudo da separação de glicocorticoides
e aplicação em formulações farmacêuticas
utilizando eletroforese capilar**

Versão corrigida da tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

26/07/2018

MAICON DE MORAIS

**Estudo da separação de glicocorticoides e
aplicação em formulações farmacêuticas utilizando
eletroforese capilar**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química*

Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M827e Morais, Maicon
 Estudo da separação de glicocorticoides e aplicação em formulações farmacêuticas utilizando eletroforese capilar / Maicon Morais. - São Paulo, 2018.
 88 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Tavares, Marina Franco Maggi

1. eletroforese capilar. 2. esteroides. 3. glicocorticoides. 4. química analítica. 5. cromatografia eletrocinética micelar. I. T. II. Tavares, Marina Franco Maggi, orientador.

***Dedico esse trabalho a todos que estiveram
próximos de mim e fizeram parte desta trajetória.***

AGRADECIMENTOS

Pessoas felizes lembram o passado com gratidão, alegram-se com o presente e encaram o futuro com confiança. Considero-me feliz por saber que tive maravilhosas pessoas ao meu lado e que estas estavam acreditando, auxiliando, escutando, incentivando e compartilhando inúmeros sentimentos para que fosse possível a realização deste projeto.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais pelos ensinamentos ao longo da vida. Se sou o que sou e estou onde estou hoje foi graças à dedicação sem limites de ambos, amo-os acima de tudo.

À minha mãe, Elsa, pelos cuidados, conversas, troca de experiências e incentivo a todas as minhas escolhas, obrigado por ser minha âncora quando eu estava perdido, por acreditar que sou capaz de tudo e, por me ajudar a ver que, graças ao seu carinho, posso aceitar quem sou.

Ao meu pai, Danilo, que batalhou para proporcionar minha educação, homem que me ensinou o que é ter caráter e que, apesar de a vida muitas vezes parecer injusta, me fazer entender que temos que lutar sem perder nossa essência e sem desistir dos nossos sonhos.

Aos meus irmãos, Odair e Cleusa, pelas conversas, risadas, palavras de ânimo e por torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus sobrinhos, William, Kamilla e Hemilly, por me enxergarem como um grande amigo, conselheiro e exemplo a ser seguido, e, graças a isso, tento a cada dia ser digno de tal admiração.

Obrigado aos meus amigos por fazerem parte da minha vida e por compartilharem comigo todos os momentos importantes, sejam eles bons ou ruins. O companheirismo e a força vinda de vocês me ajudaram a ser uma pessoa muito melhor.

Às amigadas mais antigas que, apesar da distância, me deram dicas, estímulo, conversas, risadas e grandes momentos que foram possíveis mesmo quando vários quilômetros nos separavam. Ao Gustavo, cuja amizade única e exemplar durante todos esses anos sempre me deu força e nossas aventuras em cada

visita são lembranças que ficarão para sempre. À Cristiane pelas nossas conversas mirabolantes, filosóficas, questionamentos constantes sobre a vida e nosso jeito similar de ver o mundo ajudaram, e muito, nesse processo todo. Agradeço ao companheirismo, suporte e momentos divertidos que passei com Liliane, Patrícia, Vanessa e Thiago, que fizeram com que eu me sentisse muito querido a cada encontro.

Aos amigos que São Paulo me trouxe: Marco, obrigado por me acolher e auxiliar na minha chegada, momento em que aprendia a vivenciar uma nova cidade, e também por me escutar em momentos de confusão e a me colocar pra cima quando a tristeza chegava; Rodrigo, o amigo que tinha tudo para não existir (e agradeço por ter sido o contrário), por suas conversas filosóficas e sempre profundas, por me apresentar a cidade e ensinar sobre a história local, ser sempre a pessoa que quando eu precisava desabafar estava do meu lado; e ao Augusto, por me aguentar por anos de convivência diária, estar presente na maioria dos momentos importantes e sempre me apoiar acima de tudo.

Aos novos amigos, que, mesmo presentes há pouco tempo na minha vida, foram de enorme auxílio no momento final deste trabalho. Dion, obrigado por me escutar, e tentar me fazer entender o “atual eu” num momento que eu não me reconhecia mais. E Guilherme, tuas palavras de apoio, incentivo, coragem e crença me fizeram lembrar de tudo que me considero capaz e elevaram minha autoestima, obrigado pela presença, paciência, compreensão e por ser um ótimo companheiro nessa fase conturbada e de grandes mudanças na minha vida.

Atribuo ao departamento de Química Fundamental e às pessoas, com as quais houveram trocas de conhecimento e convivência nesses espaços ao longo desses anos, a melhor experiência da minha formação acadêmica.

À Prof^a. Dr^a. Marina F. M. Tavares pela orientação, por ser modelo de inspiração tanto profissional quanto pessoal, por me incentivar, me apoiar e confiar na minha capacidade de desempenhar este projeto e atividades paralelas no grupo de pesquisa. Além disso, meu muito obrigado pelas conversas, preocupação com meu bem-estar e, principalmente, pelos conselhos pessoais e por acreditar em mim quando eu havia perdido essa capacidade.

Ao Prof. Dr. João P. S. Farah pela contribuição neste trabalho e pelos ensinamentos transmitidos sempre carregados de um humor cativante, e desta forma tornando meus dias no laboratório mais descontraídos e leves.

À Prof. Maria S. A. Prado pela ajuda na obtenção dos placebos utilizados neste trabalho.

Aos colegas de laboratório, cuja amizade e convivência tornaram o processo mais gratificante. À Carolina pelo grande auxílio nessa etapa final, pela disposição em me ajudar, mesmo à distância e ser a minha ponte com a USP nos tramites pré-defesa. À Aline, Karina e Daniel, os quais me ensinaram sobre eletroforese capilar e a mexer no equipamento, tiraram dúvidas sobre conceitos teóricos e soluções da rotina de laboratório. À Gisele, Andrea, Pedro, Fábio, Ana Rosa e Loraine por terem sempre um astral único e por compartilharem comigo momentos inesquecíveis sempre acompanhados de muitas risadas. Foram companheiros em almoços, jantares, congressos, simpósios e cursos que ficarão na memória.

À Universidade Luterana do Brasil e a todos os meus professores pela contribuição no início dessa jornada.

À CAPES pela bolsa concedida e auxílio financeiro.

À FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitaram a realização deste projeto.

Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira?

Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe,

saber que não se sabe; na verdade é este o saber.

Se não sabes, aprende; se já sabes, ensina.

(Confúcio)

RESUMO

Morais, M; **Estudo da separação de glicocorticoides e aplicação em formulações farmacêuticas utilizando eletroforese capilar**. 2018. 90p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Estudos envolvendo os glicocorticoides merecem destaque devido a serem hormônios responsáveis pela transferência de informações e instruções às células, desta forma regulando o metabolismo, desenvolvimento, crescimento, função imune e também auxiliam no controle das funções tanto reprodutivas quanto tecidual. Estes também são sintetizados e amplamente utilizados com finalidade terapêutica – processos alérgicos, tratamento de doenças autoimunes, em transplantes no pré-operatório e/ou pós-operatório-, devido a sua eficiente ação como imunossuppressores e anti-inflamatórios.

Os dois primeiros capítulos deste trabalho exibem uma revisão da literatura com foco em considerações gerais sobre os glicocorticoides, metodologias empregadas na análise destes hormônios e fundamentos da eletroforese capilar.

Na sequência, o quarto capítulo, mostra a otimização da separação de 17 glicocorticoides utilizando cromatografia eletrocinética micelar devido a alto grau hidrofóbico dos analitos. Para tal, a composição do eletrólito consistiu em 20mM de tetraborato de sódio (pH=9.3) e 30 mM de dodecil sulfato de sódio (como surfactante), e a interação soluto-micela e, portanto, retenção do soluto, foi manipulada com a adição (volume/volume) de solventes orgânicos na composição de até 20% acetonitrila (ACN), 20% etanol (EtOH) e 1% tetrahidrofurano (THF), a qual se baseia num modelo de desenho de misturas (totalizando dez diferentes eletrólitos), e através desta abordagem um ótimo de separação foi obtido (13,3% EtOH, 3,3% ACN e 0,17% THF). A melhor condição de separação foi testada qualitativamente numa amostra de urina de um voluntário que faz uso contínuo de prednisona como terapia corticoidal.

As misturas de solventes estudadas neste trabalho afetam a solubilidade dos hormônios na fase aquosa e a estrutura micelar também sofre grande impacto,

principalmente na camada de solvatação. O quarto capítulo busca racionalizar tais efeitos através da obtenção de descritores, e as informações contidas nos descritores hidrofóbicos e hidrofílicos são sempre relevantes e contribuem nas correlações encontradas. Obteve três grupos de comportamento distinto, onde a capacidade doadora e aceptora de prótons para a realização de ligações de hidrogênios foram as interações consideradas as mais relevantes para o comportamento observado da separação.

E o capítulo final, apresenta possibilidades de aproveitamento no controle de qualidade na indústria farmacêutica, métodos baseados na injeção e tensão inversas foram propostos a fim de ganho de tempo de análise (máximo de 5 minutos), estes foram validados seguindo o protocolo preconizado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) nos parâmetros: precisão, exatidão, seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação e robustez; e aplicados na quantificação de quatro (diferentes formulações comerciais contendo glicocorticoides (prednisona 20 mg, betametasona 4 mg, furoato de mometasona 200 mcg e dipropionato de beclometasona 200 mcg).

Palavras-chave: esteroides, glicocorticoides, eletroforese capilar, cromatografia eletrocínética micelar, otimização de separação, formulação farmacêutica.

ABSTRACT

Morais, M. **Study of the separation of glucocorticoids and application in pharmaceutical formulations using capillary electrophoresis.** 2018. 90p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Studies involving glucocorticoids deserve to be highlighted because they are hormones responsible for the transfer of information and instructions to cells, thus regulating metabolism, development, growth, immune function and also assist in the control of both reproductive and tissue functions. These are also synthesized and widely used for therapeutic purposes - allergic processes, treatment of autoimmune diseases, in preoperative and/or postoperative transplants - due to their efficient action as immunosuppressants and anti-inflammatories.

The first two chapters of this paper present a review of the literature focusing on general considerations about glucocorticoids, methodologies used in the analysis of these hormones and fundamentals of capillary electrophoresis.

Subsequently, the fourth chapter shows the optimization of the separation of 17 glucocorticoids using micellar electrokinetic chromatography due to the high hydrophobic degree of the analytes. To this end, the electrolyte composition consisted of 20 mM sodium tetraborate (pH = 9.3) and 30 mM sodium dodecyl sulfate (as a surfactant), and the solute-micelle interaction and therefore solute retention was manipulated with organic solvent in the composition of up to 20% acetonitrile (ACN), 20% ethanol (EtOH) and 1% tetrahydrofuran (THF), which is based on a mixture design model (totaling ten different electrolytes), and through this approach an optimal separation was obtained (13.3% EtOH, 3.3% ACN and 0.17% THF). The best separation condition was qualitatively tested in a urine sample from a volunteer who makes continuous use of prednisone as corticosteroid therapy.

The solvent mixtures studied in this work affect the solubility of the hormones in the aqueous phase and the micellar structure also has a great impact, especially on the solvation layer. The fourth chapter seeks to rationalize these effects by obtaining

descriptors, and the information contained in the hydrophobic and hydrophilic descriptors is always relevant and contributes to the correlations found. It obtained three groups of distinct behavior, where the donor and acceptor capacity of protons for the realization of hydrogen bonds were the interactions considered the most relevant for the observed behavior of the separation.

And the final chapter presents possibilities of use in quality control in the pharmaceutical industry, methods based on injection and reverse voltage were proposed in order to gain analysis time (maximum of 5 minutes), these were validated following the protocol recommended by ANVISA (Brazilian National Agency of Sanitary Surveillance) in the parameters: precision, accuracy, selectivity, linearity, limits of detection and quantification and robustness; and applied in the quantification of four different commercial formulations containing glucocorticoids (prednisone 20 mg, betamethasone 4 mg, mometasone furoate 200 mcg and beclomethasone dipropionate 200 mcg).

Keywords: steroids, glucocorticoids, capillary electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, separation optimization, pharmaceutical formulation.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.1. Biossíntese dos esteroides.....	20
Figura 1.2. Estrutura genérica dos esteroides.....	21
Figura 1.3. Glândula suprarrenal e córtex adrenal.....	23
Figura 2.1. Instrumentação para eletroforese capilar.....	35
Figura 2.2. Geração do fluxo eletrosmótico (EOF). (a) Geração das cargas negativas nas paredes e cátions hidratados na superfície do capilar. (b) Fluxo gerado pela migração proveniente do campo elétrico aplicado.....	37
Figura 2.3. Representação de um fluxo induzido por campo elétrico (eletrosmótico) e de um fluxo induzido por pressão (laminar) e sua respectiva banda.....	38
Figura 3.1. Solventes orgânicos utilizados. (A) média de acidez promovida por ligações de Hidrogênio; (B) média de basicidade promovida por ligações de Hidrogênio; (ϵ) constante dielétrica.....	48
Figura 3.4. Otimização da separação. Eletrólito base: 30 mmolL ⁻¹ SDS 20 mmolL ⁻¹ TBS e uma porcentagem de solvente orgânico. Misturas ternárias: Solvente único: A) 20% ACN, B) 20% EtOH e C) 1% THF. Mistura binária: D) 10% ACN + 10% EtOH, E) 10% EtOH + 0,5% THF e F) 10% ACN + 0,5% THF. Condição eletroforéticas: tensão aplicada: +25kV, temperatura constante: 20°C, detecção UV direta: 257nm, injeção da amostra hidroniâmica: 0,5 psi. Misturas dos glicocorticoides: concentração de 100 mg.L ⁻¹ cada (estoque preparado em meio metanol), diluído em 6 mmolL ⁻¹ SDS 4 mmolL ⁻¹ TBS.....	54
Figura 3.5. Otimização da separação. Eletrólito base: 30 mmolL ⁻¹ SDS 20 mmolL ⁻¹ TBS e uma porcentagem de solvente orgânico. Misturas ternárias: G) 6,7% ACN + 6,7% EtOH + 0,34% THF, H) 13,3% ACN + 3,3% EtOH + 0,17% THF, I) 3,3% ACN + 13,3% EtOH + 0,17% THF e J) 3,3% ACN + 3,3% EtOH + 0,67% THF. Condição eletroforéticas: tensão aplicada: +25kV, temperatura constante: 20°C, detecção UV direta: 257nm, injeção da amostra hidroniâmica: 0,5 psi. Misturas dos glicocorticoides: concentração de 100 mg.L ⁻¹ cada (estoque preparado em meio metanol), diluído em 6 mmolL ⁻¹ SDS 4 mmolL ⁻¹ TBS.....	55
Figura 3.6. Eletroferogramas do extrato da urina de um voluntário que faz uso contínuo de prednisona (a) e extrato dopado com 50 mg L ⁻¹ de padrão (b).....	58
Figura 5.1. Prednisona: injeção inlet a +25kV e injeção outlet a -15kV. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF.....	75
Figura 5.2. Betametasona: injeção inlet a +25kV e injeção outlet a -17kV. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF.....	76
Figura 5.3. Mometasona: injeção inlet a +25kV e injeção outlet a -21kV. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF.....	76
Figura 5.4. Beclometasona: injeção inlet a +25kV e injeção outlet a -21kV. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF.....	77
Figura 5.5. Linhas de base das amostras placebo para Prednisona, Betametasona, Furoato de Mometasona e Dipropionato de Beclometasona.....	79
Figura 5.6. Curva analítica para prednisona. Faixa de concentração de 25 mgL ⁻¹ a 200 mgL ⁻¹ . Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF. Tensão -15 kV, injeção pelo outlet: 0,5 psi e detecção a 257nm.....	80
Figura 5.7. Curva analítica para betametasona. Faixa de concentração de 25 mgL ⁻¹ a 200 mgL ⁻¹ . Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF. Tensão -15 kV, injeção pelo outlet: 0,5 psi e detecção a 257nm.....	81

Figura 5.8. Curva analítica para mometasona. Faixa de concentração de 25 mgL⁻¹ a 200 mgL⁻¹. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF. Tensão -15 kV, injeção pelo outlet: 0,5 psi e detecção a 257nm.....81

Figura 5.9. Curva analítica para beclometasona. Faixa de concentração de 25 mgL⁻¹ a 200 mgL⁻¹. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF. Tensão -15 kV, injeção pelo outlet: 0,5 psi e detecção a 257nm.....81

Tabela 1.1. Efeitos colaterais de hormônios esteroidais.....22

Tabela 1.2. Uso terapêuticos de glicocorticoides.....24

Tabela 3.1. Estrutura molecular dos glicocorticoides em estudo.....49

Figura 3.2. Triângulo de Mistura de Solventes.....52

Tabela 3.3. Valores de C.V. para a aplicação em urina.....58

Tabela 4.1: Efeitos do solvente na separação baseada na regressão linear múltipla do fator de retenção, log k, versus descritores.....65

Tabela 5.2. Limite de detecção e limite de quantificação para glicocorticoides.....82

Tabela 5.3. Valores de desvio padrão relativo para a repetibilidade.....82

Tabela 5.4. Valores de desvio padrão relativo para precisão intra-ensaio.....83

Tabela 5.5. Método de validação referente à exatidão (teste de recuperação)84

Tabela 5.6. Resultados das determinações de glicocorticoides em amostras comerciais.....84

LISTA DE ABREVIATURAS E SILGLAS

ACN	Acetronitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CE	Eletroforese Capilar
DM_hybZ	Componentes do Dipolo,
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção enzimática
EOF	Fluxo eletrosmótico
EtOH	Etanol
GC	Cromatografia Gasosa
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LD	Limite de Detecção
LDOS	Densidade Local de Estados
LOO	<i>Leave one out</i>
LQ	Limite de Quantificação
LSER	<i>Linear Solvation Energy Relationships</i>),
Maxch	Máxima Carga de Hidrogênio,
MC	Micela
MEKC	Cromatografia Eletrocínética Micelar
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de Massas
NaOH	Hidróxido de Sódio
P/PI	Razão Padrão/Padrão Interno
PI	Padrão Interno
QSRR	<i>Quantitative Structure–Retention Relationships</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RelacO	Somatória de Cargas de Oxigênio Sobre a Área de Oxigênio
RelaTcO	Somatória de Cargas de Oxigênio Sobre a Área Total da Estrutura
RelatmO	Área Relativa de Oxigênio de Máxima Carga Mülliken

RIA	Radioimunoensáio
ScH	Somatória de Cargas de Hidrogênio
SD	Desvio Padrão das Respostas
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SiO	Silanoatos
SiOH	Silanois
SmaH	Somatória de Carga Mulliken Vezes Área de Hidrogênio,
SmO	Somatória de Carga Mülliken de Oxigênio
SrcH	Somatória Relativa de Cargas de Hidrogênio
SrcO	Somatória Relativa de Cargas de Oxigênio
SrmH	Somatória Relativa de Cargas Mülliken de Hidrogênio
SrmO,	Somatória Relativa de Cargas Mülliken de Oxigênio,
TBS	Tetraborato de Sódio
THF	Tetrahidrofurano
USP	United States Pharmacopeia
UV/Vis	Ultravioleta/Visível

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: GLICOCORTICOIDES.....	19
1. ESTEROIDES	20
1.1. Estrutura e Propriedades	21
2. GLICOCORTICOIDES.....	23
3. ANALISE DE CORTICOIDES.....	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
CAPÍTULO II: ELETROFORESE CAPILAR.....	34
1. FUNDAMENTOS	35
1.1. Fluxo eletrosmótico	36
1.2. Mobilidade eletroforética.....	38
2. CLASSIFICAÇÃO.....	40
2.1. Isotacoforese Capilar.....	40
2.2. Eletroforese Capilar em Gel	41
2.3. Eletroforese Capilar de Zona	41
2.4. Eletrocromatografia Capilar	41
2.5. Cromatografia Eletrocínética Micelar	42
3. REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO III: ESTUDO DA SEPARAÇÃO DE GLICOCORTICOIDES VIA MEKC	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. OBJETIVO.....	50
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	50
3.1. Equipamento e Método.....	50
3.2. Reagentes.....	51
3.3. Padrões.....	51
3.4. Eletrólitos	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
4.1. Comportamento Eletroforético e Efeito do Solvente	56

4.2. Aplicação do método	57
5. CONCLUSÃO	59
6. REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO IV: QSRR - APLICADO A GLICOCORTICOIDES	61
1.1. QSRR e os Hormônios Esteroidais	62
2. OBJETIVO	63
3. PARTE EXPERIMENTAL	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
5. CONCLUSÃO	67
6. REFERÊNCIAS	68
CAPÍTULO V: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE GLICOCORTICOIDES EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS	70
1. INTRODUÇÃO	71
2. OBJETIVO	72
3. PARTE EXPERIMENTAL	72
3.1. Condições instrumentais	72
3.2. Soluções	73
3.3. Eletrólito	73
3.4. Padrões	73
3.5. Curva de calibração	74
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	74
4.1. Desenvolvimento do método	74
4.2. Validação do Método	77
4.3. Análise	84
5. CONCLUSÃO	85
6. REFERÊNCIAS	86

CAPÍTULO I:
GLICOCORTICOIDES

1.1. Estrutura e Propriedades

Os esteroides apresentam um anel tetracíclico ABCD (Figura 1.2) chamado de núcleo esteroide (peridro-1,2-ciclopentanofenantreno), ao qual podem existir grupos funcionais específicos ligados ao centro esteroide (hidroxi, ceto, aldeído, halogênio e ainda uma função fenólica no caso dos estrógenos que possuem o anel “A” sendo aromático) e de acordo com o número de grupos total de átomos de carbono na sua estrutura são divididos em seis grupos [3,4]:

- C₁₇ (Gonanas): Gonana (sendo o núcleo esteroide propriamente dito);
- C₁₈ (Estranas): Estradiol e Estrona;
- C₁₉ (Androstanas): Androsterona;
- C₂₁ (Pregnanas): Progesterona e Cortisol;
- C₂₄ (Cholanas): Ácidos Biliares;
- C₂₇ (Cholestanas): Colesterol.

Sistematicamente os nomes dos esteroides foram definidos pela IUPAC – Comissão em Nomenclatura de Compostos Orgânicos e pela IUPAC-IUB - Comissão Nomenclatura Bioquímica [6-9].

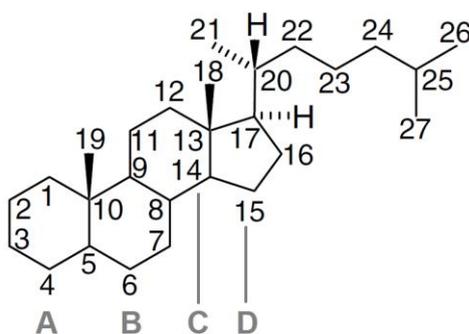


Figura 1.2. Estrutura genérica dos esteroides

Estes compostos merecem destaque devido a serem responsáveis pela transferência de informação e instruções às células, desta forma regulando o metabolismo, desenvolvimento e crescimento, e também auxiliam no controle das funções tanto reprodutivas quanto de alguns tecidos [10-14]. São sintetizados e amplamente utilizados com finalidade terapêutica – processos alérgicos, reposição

hormonal, anticoncepcionais, tratamento de doenças autoimunes, em transplantes no pré-operatório e/ou pós-operatório, devido a sua eficiente ação como imunossupressores e anti-inflamatórios [15-18] –, contudo se ministrados de maneira incorreta, podem trazer severos efeitos colaterais (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Efeitos colaterais de hormônios esteroidais [19].

Cardiovasculares	Geniturinários
Alterações no perfil lipídico	Ginecomastia
Pressão arterial elevada	Mudanças de libido
Diminuição da função miocárdica	<u>Homens</u>
<u>Dermatológicos</u>	Decréscimo de espermatozoides
Acne	Diminuição do tamanho testicular
Calvice	<u>Mulheres</u>
<u>Psicológicos</u>	Clitoromegalia
Depressão	Irregularidades menstruais
Agressividade	Masculinização
Mudanças de humor	

Os hormônios esteroidais desempenham biologicamente funções essenciais e de acordo com elas são classificadas em:

- l) Hormônios sexuais: a) prostágenos, onde se tem a progesterona como principal esteroide, e este tem papel essencial na gestação, onde além de preparar o útero para receber o óvulo fecundado é responsável pela manutenção do mesmo; b) andrógenos, tendo como principal representante a testosterona, denominada como anabolizante natural, e responsável pelas características masculinas, controle da libido, crescimento de tecidos e manutenção do metabolismo de proteínas; e c) estrógenos, sendo estradiol, estriol e estrona os principais, e tais hormônios são responsáveis pela manutenção e desenvolvimento do sistema reprodutor feminino, assim como são os determinantes das características sexuais femininas secundárias (mamas e distribuição de gordura, por exemplo) [1- 3,6,10-12, 20].

II) Mineralocorticoides: aldosterona é o hormônio que merece destaque, e estes agem como reguladores eletrolíticos, da pressão arterial; da volemia e pH do sangue [1-3,6,10-12];

III) Glicocorticoides: o cortisol é considerado o mais importante, sustentando e regulando as funções metabólicas, imunológicas, homeostáticas, cardiovasculares, anti-inflamatórias, e também regulando os níveis de açúcar sanguíneo e glicogênio hepático [6,10-12,15,16].

2. GLICOCORTICOIDES

Os glicocorticoides são naturalmente sintetizados pelo córtex adrenal, parte mais externa da glândula suprarrenal (adrenal), a qual fica localizada sobre os rins (Fig 1.3); e são compostos de enorme importância fisiológica e para a manutenção de vários órgãos, devido a sua participação em mecanismos homeostáticos [21]. A hidrocortisona (cortisol) é o principal glicocorticoide e é produzido por volta de 10mg/dia deste composto, sendo esta metabolizada pelo fígado [22].

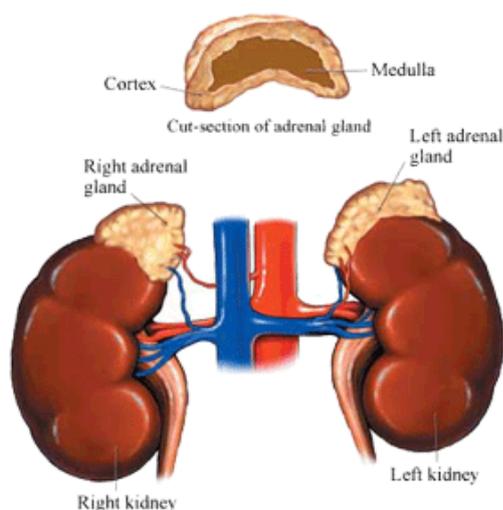


Figura 1.3. Glândula suprarrenal e córtex adrenal.
Fonte: Adrenal Fatigue².

²Disponível em: <https://www.adrenalfatigue.co.nz/adrenal-gland-function/> ; acesso em Maio de 2018.

Em particular, merece destaque nesse grupo de hormônios a sua grande capacidade anti-inflamatória, e isso se deve a sua lipossolubilidade, possuindo assim a aptidão de permear a membrana celular por difusão passiva e se ligarem aos receptores citoplasmáticos, e assim migrar para o núcleo e desta forma sendo capazes de interagir com o DNA e regular/suprimir/ativar diferentes genes mediadores do processo inflamatório, seja pelo envio de citocinas, moléculas de adesão (as quais recrutam células imunológicas para a região inflamada) ou a síntese de enzimas induzíveis [22,23]. Devido a esta característica os glicocorticoides são amplamente utilizados para fins medicinais, e a síntese de análogos utilizando o cortisol como base, que potencializem essa ação, são comuns na indústria farmacêutica [24].

Os glicocorticoides tornaram-se um pilar clínico para o tratamento de numerosas doenças inflamatórias e autoimunes. E devido a suas profundas ações imunomoduladoras, são um dos grupos de medicamentos mais prescritos no mundo e movimenta um mercado de cerca de US\$ 10 bilhões por ano [24]. A tabela abaixo mostra os usos mais comuns da terapia glicocorticoide.

Tabela 1.2. Uso terapêuticos de glicocorticoides.

Condições Alérgicas	Doenças Imunomediadas
Anafilaxia	Anemia Hemolítica
Asma	Artrite Reumática
Dematite	Dermatopatia
Rinite	Lupus Eritematoso Sistemico
Desordens Metabólicas	Miopatia
Hipoadrenocorticismo	Trombocitopenia
Hipercalcemia	
Hiperparatiroidismo	
Inflamação	Transplante
Inflamação do Sistema Nervoso Central	Imunossuppressores

Apesar dos evidentes benefícios da terapia com glicocorticoides, existe a necessidade de usá-los com cautela, devido aos severos efeitos colaterais que estes compostos trazer, tanto a curto quanto a longo prazo. A duração, dosagem, regime de dosagem, escolha do fármaco apropriado, seu modo de aplicação depende da situação clínica e ter em conta a relação risco-benefício [40].

Efeitos colaterais de corticoides [40,41]:

- Pele: estrias, cicatrização tardia de feridas, dermatite perioral, eritema, teleangiectasia, hipertricosose;
- Osseomuscular: atrofia, miopatia, osteoporose, necrose óssea;
- Olhos: glaucoma, catarata;
- Sistema nervoso central: distúrbios de humor, comportamento, memória e cognição, psicose, atrofia cerebral;
- Sistema endócrino: diabetes, atrofia adrenal, retardo de crescimento, puberdade tardia, retenção de sais;
- Sistema cardiovascular: hipertensão, trombose, vasculite;
- Sistema imunológico: maior risco de infecções oportunistas, reativação de vírus latentes;
- Gastrointestinal: úlcera peptídica, pancreatite, sangramento gastrointestinal;

Os efeitos colaterais ocorrem com diferentes prevalências, em diferentes órgãos, e depois de diferentes durações da terapia. O grau de severidade pode ser de aspectos mais estéticos, como inchaço, a situações até mesmo fatais, como hemorragia gástrica, por exemplo [40,41].

Visto que tais complicações podem surgir, existe a necessidade do desenvolvimento de novas substâncias com efeitos colaterais reduzidos, assim como o desenvolvimento de métodos de análise para controle tanto de qualidade dos fármacos comercializados, como da dosagem terapêutica em pacientes de uso contínuo.

3. ANÁLISE DE CORTICOIDES

Os imunoensaios são amplamente utilizados na análise de esteroides, técnicas imunológicas são atraentes por causa da simplicidade e velocidade. Estes são baseados na revelação interação antígeno-anticorpo, a reação pode ser por

radiação utilizando um isótopo de marcador (radioimunoensáio – RIA) ou imunoenzimático (enzyme linked immunosorbent assay – ELISA). Em contrapartida neste tipo de análise se consegue identificar somente um hormônio por vez, aumentando custo e tempo do ensaio, além deste fato, existe a dificuldade de obtenção dos anticorpos específicos (visto que os esteroides são muito similares em sua estrutura) e pode haver casos de reações cruzadas, assim mascarando os resultados [41-47].

Para os testes de confirmação, técnicas cromatográficas, tais como Cromatografia Líquida e Cromatografia Gasosa, acopladas à Espectrometria de Massas são requeridas. Tais abordagens requerem operadores qualificados, instrumentação complexa, cuja manutenção é relativamente cara, e muitas vezes as amostras necessitam de derivatização antes da injeção [48-51]

A Eletroforese Capilar tornou-se uma alternativa para os métodos de Cromatografia Líquida e Cromatografia Gasosa devido às suas características de desempenho vantajosas (eficiência elevada, elevado poder de resolução, e tempo de análise curto), baixos custos de funcionamento, e rápido desenvolvimento de método. Além disso, Eletroforese Capilar requer um pequeno volume de amostra (injeção é da ordem de poucos nano litros), e trabalha com eletrólitos aquosos preferencialmente, aditivados com uma grande variedade de compostos modificadores de fluxo ou da mobilidade do analito. A determinação de esteroides, no âmbito farmacêutico e de fluidos corporais, representa uma das áreas de interesse de aplicação da Eletroforese Capilar [52-55].

A maioria dos esteroides são moléculas neutras, assim, tanto cromatografia eletrocinética micelar como eletrocromatografia capilar são os modos recomendados de Eletroforese Capilar para iniciativas de desenvolvimento de métodos. Vários métodos EKC para esteroides têm sido descritos na literatura e a determinação de esteroides na urina é a mais evidenciada. Geralmente a detecção é realizada por absorção no UV-VIS, embora necessidade de derivatização ter sido relatado na literatura. Os esteroides também têm sido utilizados como compostos modelo em uma série de outras abordagens que envolvem lipossomas e em estudos fundamentais, visando a determinação de constantes de associação [56-63].

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BERG J.M., STRYER L., TYMOCZKO J. L., Bioquímica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008; 756-757.

[2] NELSON D. L., COX, M. M., Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2011; 1100p.

[3] SILVA C. A., Estudos Fundamentais e Aplicações Envolvendo Hormônios Esteroides por Meio de Eletroforese Capilar, Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007; 185p.

[4] KASAL A. Chapter 1: Structure and Nomenclature of Steroids. In: MAKIN H.L.J. GOWER, D.B. (Eds.), Steroid Analysis, 2010; 25p.

[5] MURRAY R. K., BENDER D. A., BOTHAM K. M., KENNELLY P. J., RODWELL V. W., WEIL P. A., Harper's Illustrated Biochemistry, 29th Ed. Appleton & Lange: Stamford, CT, 2009; 818p.

[6] COOKE-FOX D. I., KIRBY G. H., LORD M. R., RAYNER J. D., Computer translation of IUPAC systematic organic chemical nomenclature. 5. Steroid nomenclature. Journal Chem. Inj Comput. Sci. 30, 1990; 128-132

[7] MOSS G.P., The Nomenclature of Steroids, IUPAC Recommendations, 1989 Disponível: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/steroid/>. Acessado em maio de 2018.

[8] IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry, Definitive rules for nomenclature of steroids. Pure appl Chem, 31, 1972; 285-322

[9] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclatures, The nomenclature of steroids, recommendations 1989. Eur J Biochem, 186, 1989; 429-458

[10] HOLST J. P., SOLDIN O. P., GUO T., SOLDIN S. J., Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory. Clin Lab Med, 24, 2004; 105–118

[11] GOWER D. B., MAKIN H. L. J., Steroid Analysis, 2nd Ed. Springer:London, 2010; 1224p.

[12] CHAMPE, P. C., HARVEY, R. A., FERRIER, D. R., *Bioquímica Ilustrada*. 4ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008; 528p.

[13] MOLINA P. E., *Endocrine Physiology*, 3rd Ed. Lange:USA, 2009; 336p.

[14] MONSALVE A. O., *Endocrinología*, 2ª Ed. Editorial Universidad de Antioquia:Colombia, 2009; 418p.

[15] KLEIMAN A., TUCKERMANN J. P., Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: Lessons from conditional knockout mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275, 2007; 98–108

[16] SATHASIVAM S., Steroids and immunosuppressant drugs in myasthenia gravis. *Nature Clinical Practice Neurology*, 4, 2008; 317-327

[17] COWAN D. C., COWAN J. O., PALMAY R., WILLIAMSON A., TAYLOR D. R., Effects of steroid therapy on inflammatory cell subtypes in asthma. *Thorax*, 65, 2010; 384-390

[18] KAMISAWA T., OKAMOTO A., WAKABAYASHI T., WATANABE H., SAWABU N., Appropriate steroid therapy for autoimmune pancreatitis based on long-term outcome. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 46, 2008; 609-613

[19] HOFFMAN J. R., RATAMESS N. A., Medical Issues Associated with Anabolic Steroid Use: Are They Exaggerated?. *Journal of Sports Science & Medicine*, 5(2), 2006; 182–193.

[20] BOUMAN A., HEINEMAN M. J., FAAS M. M., Sex hormones and the immune response in humans. *Human Reproduction Update*, V11, 4, 2005; 411–423

[21] DONATTI T. L., KOCH V. H. K., PEREIRA M. R., Os glicocorticoides seus efeitos no crescimento e na mineralização óssea. *Jornal de Pediatria*, V85, 1, 2011; 1-9.

[22] BUTTGEREIT F, WEHLING M, BURMESTER G. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions. Steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum*, 41:, 1998; 761-767.

[23] SLOMINSKI A. T., ZMIJEWSKI M. A., Glucocorticoids inhibit wound healing: novel mechanism of action. *Journal of Investigative Dermatology*, V137, 5, 2017, Pages; 1012-1014.

[24] RAMAMOORTHY S., CIDLOWSKI J. A., Corticosteroid Mechanisms of Action. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 42, 1, 2016; 15-31.

[25] MICHAELSON K. A., MONOTEAUS M. C., NEWMAN M. I., Glucocorticoids and Hospital Length of Stay for Children with Anaphylaxis: A Retrospective Study. *The Journal of Pediatrics*, 167, 3, 2015; 719-724.

[26] CHEN Y., Clinical analysis of glucocorticoid in the treatment of bronchial asthma and its influence on serum markers. *Chinese Journal of Primary Medicine and Pharmacy*, 23, 2015; 3646-3648.

[27] TERAO M., ITOI S., MATSUMURA S., YANG L., MUROTA H., KATAYAMA I., Local Glucocorticoid Activation by 11b-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 in Keratinocytes. *The American Journal of Pathology*, 186, 6, 2016; 1499-1510.

[28] WHEATLEY L. M., TOGIAS A., Allergic Rhinitis. *The New England Journal of Medicine*., 372, 5, 2015, 456-463.

[29] BARTALENA L., TANDA M. L., PIANTANIDA E., ADRIANA LAI A., Glucocorticoids and outcome of radioactive iodine therapy for Graves' hyperthyroidism. *European Journal of Endocrinology*, 153, 2005; 13–14.

[30] KUCHAY, M.S., MISHRA, S.K., BANSAL, B., Glucocorticoid sparing effect of zoledronic acid in sarcoid hypercalcemia. *Archives of Osteoporosis*, 12, 68, 2017; 1-5.

[31] AZZOUG S., BOULAAM H., MESKINE D., CHENTLI F., Severe hypercalcemia secondary to primary hyperparathyroidism, *International Journal of Clinical Case Reports*, 7, 9, 2017; 38-41.

[32] SAUVAGE M. A. C., MAATOUK L., ARNOUX I., PASCO M., DIEZ A.S., DELAHAYE M., HERRERO M.T., NEWMAN T.A., CALVO C. F., AUDINAT E., TRONCHE F., VYAS S. Potent and multiple regulatory actions of microglial glucocorticoid receptors during CNS inflammation, *Cell Death and Differentiation*, 20, 2013; 1546–1557.

[33] KUSUMA S. H., AKIL F., RIFAI A., BACHTIAR R. R., DAUD N A. S., PAREWANGI A. M. L., Concomitant Case of Primary Biliary Cirrhosis and Autoimmune Hemolytic Anemia Responding to Corticosteroid and Ursodeoxycholic Acid in Young Woman. *The Indonesian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Digestive Endoscopy*, 17, 3, 2016; 208-2011.

[34] SINGH, J. A., SAAG, K. G., BRIDGES, S. L., AKL, E. A., BANNURU, R. R., SULLIVAN, M. C., VAYSBROT, E., MCNAUGHTON, C., OSANI, M., SHMERLING, R. H., CURTIS, J. R., FURST, D. E., PARKS, D., KAVANAUGH, A., O'DELL, J., KING, C., LEONG, A., MATTESON, E. L., SCHOUSBOE, J. T., DREVLOW, B., GINSBERG, S., GROBER, J., ST.CLAIR, E. W., TINDALL, E., MILLER, A. S. AND MCALINDON, T., 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 68, 1, 2016; 1–26.

[35] SENA L. B., OLIVEIRA D. L., PAULA, CARMEN D. R., COSTA M. C., FRANCESCHI L. E. A. P, COSTA I. M. C., *Trichophyton rubrum* dermatophytosis in a patient under chronic use of systemic corticoids: an exuberant presentation. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 90, 4, 2015; 598-599.

[36] RUIZ-ARRUZA I., LOZANO J., CABEZAS-RODRIGUEZ I., MEDINA JA., UGARTE A., ERDOZAIN JG., RUIZ-IRASTORZA G., Restrictive Use of Oral Glucocorticoids in Systemic Lupus Erythematosus and Prevention of Damage Without Worsening Long-Term Disease Control: An Observational Study. *Arthritis Care & Research*, 70, 4, 2018; 582–591.

[37] SWEIDAN A. J., LEUNG A., KAISER C. J., STRUBE S. J., DOKUKIN A. N., ROMANSKY S., FARJAMI S. A Case of Statin-Associated Autoimmune Myopathy. *Clinical Medicine Insights. Case Reports*, 10, 2017; 1-4.

[38] XU X., LIANG M., DOU S., WANG J., ZHANG X., Evaluation of glucocorticoid compared with immunoglobulin therapy of severe immune thrombocytopenia during pregnancy: Response rate and complication. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2018; 1-7.

[39] SANYAL D., GUPTA S., DAS P., A retrospective study evaluating efficacy and safety of linagliptin in treatment of NODAT (in renal transplant recipients) in a real world setting. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 17, 1, 2013; 203-205.

[40] ANTI S. M. A., GIORGI R. D. N., CHAHADE W. H., Antiinfl amatórios hormonais: Glicocorticóides. *Einstein*, 6, 1, 2008; 159-165.

[41] SCHACKE H., DOCKE WD., ASADULLAH K., Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 2002; 23 – 43.

[42] LYNCH J. W., ALTMANN J., NJAHIRA M. N., REBENSTEIRA N., Concentrations of four fecal steroids in wild baboons: Short-term storage conditions and consequences for data interpretation. *Gen Comp Endocr*, 132, 2003; 264-271

[43] SWART N., POOL E., Rapid Detection of Selected Steroid Hormones from Sewage Effluents using an ELISA in the Kuils River Water Catchment Area, South Africa, *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 28, 2007;395–408

[44] GUZMÁN J. M., NORBERG B., RAMOS J., MYLONAS C. C., MAÑANÓS E. L. Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *General and Comparative Endocrinology* 156, 2008; 285–297

[45] AL-DUJAILI E. A. S., MULLINS L. J., BAILEY M. A., ANDREW R., KENYON C. J. Physiological and pathophysiological applications of sensitive ELISA methods for urinary deoxycorticosterone and corticosterone in rodents. *Steroids*, 74, 2009;938-944

[46] NEWMANN A. E.M., CHIN E. H., SCHMIDT K. L., BOND L., WYNNE-EDWARDS K. E., SOMA K. K. Analysis of steroids in songbird plasma and brain by coupling solid phase extraction to radioimmunoassay. *General and Comparative Endocrinology*, 155, 2008; 503-510

[47] STANCZYK F. Z., LEE J. S., SANTEN R. J. Standardization of Steroid Hormone Assays: Why, How, and When?. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*,19,2007; 1713-1719

[48] HSING A. W., STANCZYK F. Z., BÉLANGER A., SCHROEDER P., CHANG L., FALK R. T., FEARS T. R. Reproducibility of Serum Sex Steroid Assays in Men by RIA and Mass Spectrometry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16, 2007; 1004-1008

[49] CHEN C. Y., WEN T. Y., WANG G. S., CHENG H. W., LIN Y. H., LIEN G. W. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Science of The Total Environment*, 378,2007; 352–365

[50] KOYAMA Y., HOMMA K., MIWA M., IKEDA K., MURATA M., HASEGAWA T. Measurement of reference intervals for urinary free adrenalsteroid levels in Japanese newborn infants by using stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta Available Online*, 2012

[51] GEORGAKOPOULOS C. G., VONAPARTI A., STAMOU M., KIOUSI P., LYRIS E., ANGELIS Y. S., TSOUPRAS G., WUEST B., NIELEN M. W. F., PANDERI I., KOUPPARIS M., Preventive doping control analysis: liquid and gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for detection of designer steroids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*,21, 2007: 2439–2446

[52] SUNTORNSUK L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Anal Bioanal Chem*, 398,2010;29-52

[53] CHEN H., DENG Q., ZHANG L., ZHANG X. Quantification of testosterone and epitestosterone in biological samples by capillary electrophoresis with immunoaffinity extraction. *Talanta*, 78, 2009; 464–470

[54] WELLNER E. F., KALISH H. A chip-based immunoaffinity capillary electrophoresis assay for assessing hormones in human biological fluids. *Electrophoresis*, 29, 2008; 3477–3483

[55] KOSTAL V., KATZENMEYER J., ARRIAGA E. A. Capillary Electrophoresis in Bioanalysis. *Anal Chem*,80, 2008; 4533–4550

[56] ZHANG J., KONECNY J., GLATZ Z., HOOGMARTENS J. SCHEPDAEL A V. Application of Capillary Electrophoresis in Drug Metabolism Studies. *Current Analytical Chemistry*, 3,2007;197-217

[57] SIREN H., SEPPANEN-LAAKSO T., ORESIC M. Capillary electrophoresis with UV detection and mass spectrometry in method development for profiling metabolites of steroid hormone metabolism. *Journal of Chromatography B*,871, 2008 ;375–382

[58] BESSONOVA E. A., KARTSOVA L. A. Determination of Steroids in Biological Samples by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 62, 2007; 76-84

[59] ZHANG L., CHEN J., HE Y., CHI Y., CHEN G. A new mixed micellar electrokinetic chromatography method for analysis of natural and synthetic anabolic steroids. *Talanta*, 77, 2009;1002–1008

[60] AMUNDSEN L. K., NEVANEN T. K., TAKKINEN K., ROVIO S., SIREN H. Microscale immunoaffinity SPE and MEKC in fast determination of testosterone in male urine. *Electrophoresis*,28, 2007; 3232–3241

[61] SILVA C. A., PEREIRA E. A., MICKE G. A., FARAH J. P. S., TAVARES M. F. M. Mixture-designed electrolytes for the MEKC separation of natural and synthetic steroids. *Electrophoresis*,28,2007, 3722–3730

[62] JANICKA M., STEPNIK K., PACHUTA-STEĆ A. Quantification of Lipophilicity of 1,2,4-Triazoles Using Micellar Chromatography. *Chromatographia*. 75, 2012; 449–456.

[63] PYKA A., Topological Indexes and QSRR Methodology in Pharmaceutical and Chemical Analysis. *Journal of AOAC International*, 95, 2012; 673-690

CAPÍTULO II:
ELETROFORESE
CAPILAR

1. FUNDAMENTOS

A eletroforese capilar é uma técnica de separação que se baseia na migração de partículas ou moléculas sob a influência de um campo elétrico, para a realização deste fenômeno é necessária a presença de um meio condutor e a capacidade de as espécies se ionizarem [1]. Por se tratar de uma técnica com uma simplicidade instrumental, mecanismos de separação diferenciados (podendo ser aplicada em compostos de diferentes classes) através da associação de eletrólitos específicos e o uso de uma única coluna capilar, a técnica avançou consideravelmente e atraiu a atenção de muitos cientistas após a década de 80 [2].

O fenômeno de separação desta técnica ocorre num tubo capilar (comumente de sílica fundida) com diâmetros internos microscópicos (10 – 100 μm) e o comprimento variando de acordo com a aplicabilidade, tendo relatado na literatura comprimentos de 40 a 100 cm. O capilar é preenchido com eletrólito e conectado a recipientes que contém o mesmo eletrólito interno do tubo; nestes recipientes são conectados os eletrodos responsáveis pela aplicação de uma alta diferença de potencial (podendo chegar a até 30kV) que é a responsável pela migração dos constituintes do meio, e estes migram em direção contrária à sua carga [3]. Existe a necessidade de manter o capilar em temperatura constante, buscando assim minimizar os efeitos térmicos, pois estes mudam a viscosidade do meio e alteram os resultados esperados; para este fim entre as possibilidades de termostatar o sistema existem a de circulação de ar ou de líquido através do cartucho contendo o capilar [4]. Um esquema simplificado é apresentado na Figura 2.1.

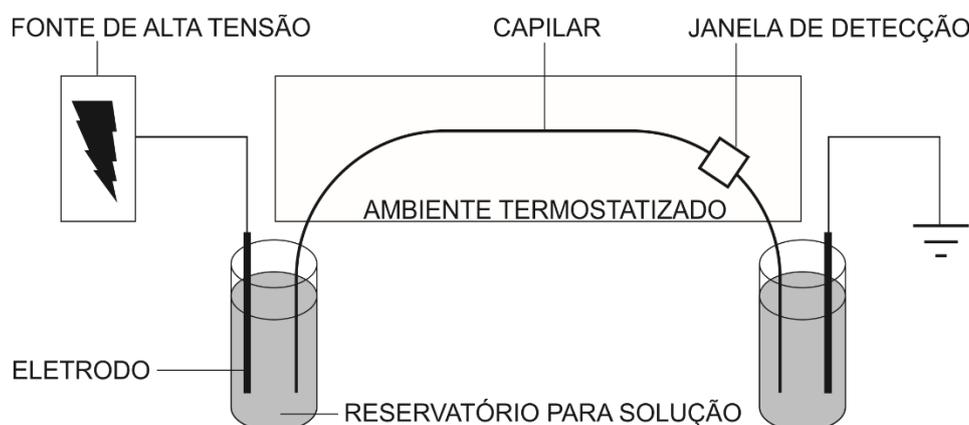


Figura 2.1. Instrumentação para eletroforese capilar.

O uso do capilar oferece muitas vantagens, como dissipação de calor gerado pela corrente elétrica devido aos fatores geométricos (relação área superficial frente volume ser elevada), alta resistência a elevados campos elétricos, resultando em separações mais eficientes (geralmente superando 10^5 pratos teóricos), tempos de análise curtos, consumo de amostras na faixa de nano litros e mínima geração de resíduos [6-9].

Apesar de mais comumente ser utilizada a detecção via UV/Vis, preferencialmente com arranjo de diodos, pois este tem a vantagem da análise em diferentes comprimentos de onda, podem ser utilizados diferentes tipos de detectores na eletroforese capilar, por exemplo: fluorescência, condutividade, amperométrico, espectrometria de massas, etc. [10]

Podendo ser de forma hidrodinâmica ou eletrocinética, a inserção da amostra no capilar é geralmente no sentido do anodo. Na sequência é aplicada a diferença de potencial, o qual gera um campo elétrico que faz com que as espécies se movimentem, e a velocidade deste movimento depende primariamente da carga do composto, seguida de seu volume [11]. Para melhor elucidação do mecanismo de separação da eletroforese capilar é necessária uma compreensão acerca dos dois fenômenos que regem a separação; o fluxo eletrosmótico e a mobilidade eletroforética.

1.1. Fluxo eletrosmótico

Este fenômeno tem origem na parede interna do capilar de sílica fundida, pois ocorre a ionização dos grupos silanóis (SiOH) a silanoato (SiO^-) quando o pH supera 3; se trata de um fenômeno eletrocinético provocado pelo campo elétrico e pela carga da camada de silanoatos. Os silanoatos atraem os cátions presentes no eletrólito, formando uma camada pseudo-estacionária, a qual busca estabilizar a carga negativa da superfície capilar [12].

Devido ao excesso de carga negativa, uma segunda camada se forma, denominada camada Stern, composta por uma fase fixa e uma móvel, e desta última devido a ação do campo elétrico ocorre a migração destes cátions externos a dupla camada, e são atraídos ao cátodo, devido a sua solvatação, ocorre o arraste do

volume total da solução [13,14], além disso, a magnitude do fluxo depende do eletrólito, pH e demais condições utilizadas nas separações [14,15], a Figura 2.2. demonstra tal efeito, o qual gera este fluxo.

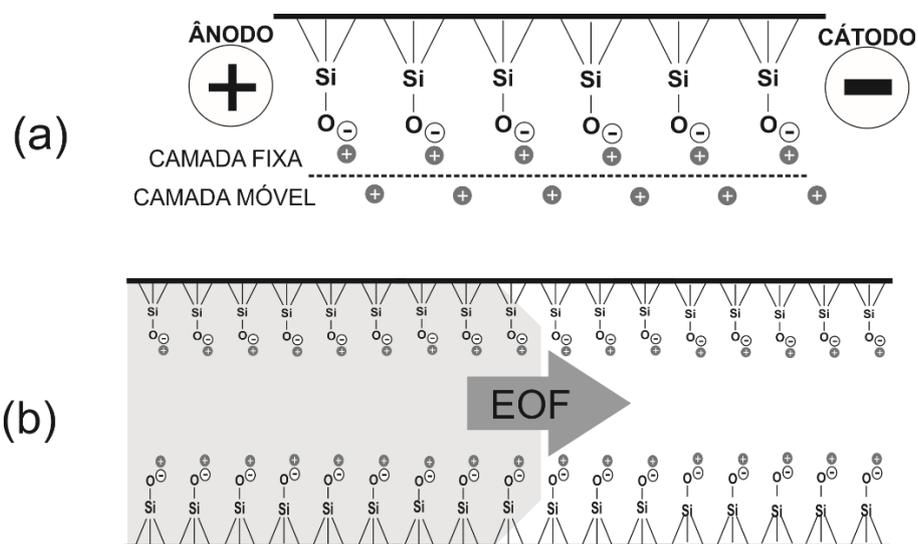


Figura 2.2. Geração do fluxo eletrosmótico (EOF). (a) Geração das cargas negativas nas paredes (SiO⁻) e cátions hidratados na superfície do capilar. (b) Fluxo gerado pela migração proveniente do campo elétrico aplicado.

Uma importante característica da eletroforese capilar é que o fluxo eletrosmótico apresenta um perfil radial linear de velocidade, e isto difere de outros métodos cromatográficos, os quais apresentam um perfil parabólico, provenientes do fluxo laminar, que é induzido exclusivamente pela pressão aplicada para a separação e este feito está diretamente ligado a alargamentos de bandas (Figura 2.3.) graças a esta particularidade, a eletroforese capilar adquire uma maior eficiência se comparado as outras técnicas cromatográficas [16].

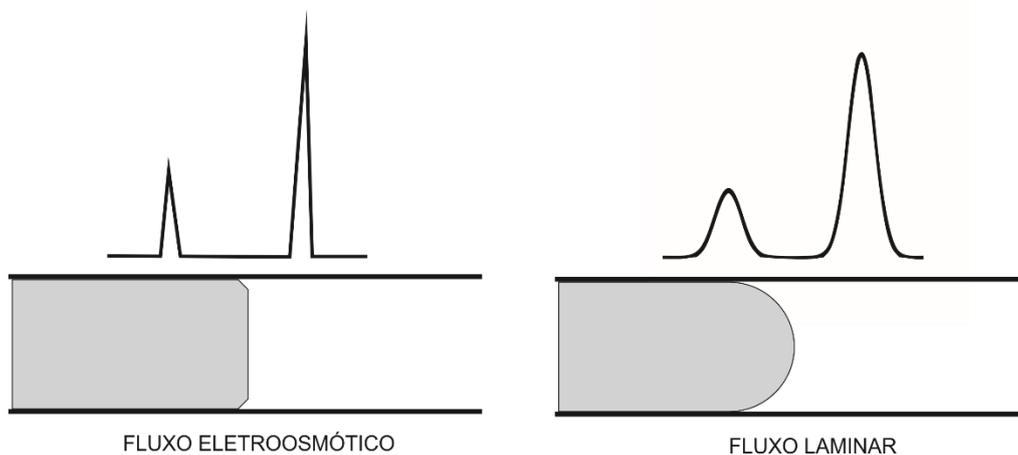


Figura 2.3. Representação de um fluxo induzido por campo elétrico (eletrosmótico) e de um fluxo induzido por pressão (laminar) e sua respectiva banda.

A velocidade do fluxo eletrosmótico (v_{osm}) é dado por:

$$v_{osm} = \frac{\varepsilon\zeta E}{4\pi\eta} \quad (1)$$

Onde:

E: campo elétrico

ε : constante dielétrica do eletrólito

ζ : potencial zeta

η : viscosidade do eletrólito

A mobilidade eletrosmótica (μ_{osm}) depende exclusivamente das características do eletrólito e não depende do campo elétrico aplicado.

$$\mu_{osm} = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta} \quad (2)$$

1.2. Mobilidade eletroforética

Sob a influência de um campo elétrico (E), uma força eletrostática (F_e) faz com que o eletrólito no interior do capilar tenha seus íons atraídos em direção aos eletrodos com cargas opostas (q).

$$F_e = qE \quad (3)$$

Conforme o íon vai acelerando, chegando a uma velocidade (v) partindo do estado de equilíbrio, surge a força que tende a retardá-lo, chamada de força friccional (F_f), e esta pode ser expressa por:

$$F_f = 6\pi\eta r v \quad (4)$$

Onde:

η : viscosidade da solução

r : raio da espécie

v : velocidade do íon na solução

Chegando no estado de entre as duas forças F_e e F_f os íons passam a mover-se com uma velocidade constante, dada por:

$$v_{ef} = \mu_{ef} E \quad (5)$$

Onde:

v_{ef} : velocidade eletroforética

μ_{ef} : mobilidade eletroforética

E : campo elétrico

A constante μ_{ef} é análoga a μ_{osm} , portanto ao combinar-se as equações 3-5, obtém-se a seguinte relação:

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi n r} = \frac{v_{ef}}{E} \quad (6)$$

A velocidade do soluto é influenciada pelos parâmetros de fluxo eletrosmótico e mobilidade eletrosmótica. E a velocidade observada, ou total, é dada por:

$$v_{tot} = v_{ef} + v_{osm} \quad (7)$$

A mobilidade aparente (μ_{ap}) é outro fator importante, e considera a contribuição da mobilidade do fluxo eletrosmótico (μ_{osm}) e da mobilidade eletroforética (μ_{ef}) dos íons. E é dada por:

$$\mu_{tot} = \mu_{ef} + \mu_{osm} \quad (8)$$

Todos os parâmetros podem ser calculados experimentalmente por:

$$t_i = \frac{L_{det}}{v_{tot}} = \frac{L_{det}}{v_{ef} + v_{osm}} = \frac{L_{det} \cdot L_{tot}}{(\mu_{ef} + \mu_{osm})V} \quad (9)$$

Onde:

t_i : tempo de migração

L_{det} : comprimento do capilar até o detector

L_{tot} : comprimento total do capilar

V : tensão aplicada

2. CLASSIFICAÇÃO

São vários os modos de operação da eletroforese capilar, e graças a estes, a versatilidade da técnica a faz aplicável em diferentes meios e analitos, cada qual com sua particularidade.

2.1. Isotacoforese Capilar

A isotacoforese capilar consiste em confinar o soluto entre eletrólitos de propriedades distintas. O primeiro eletrólito possui a mobilidade mais alta que qualquer componente da amostra, e este é denominado eletrólito líder, já o segundo eletrólito, denominado terminador, ocupa a outra parte do capilar, e este possui a mobilidade iônica menor que qualquer componente da amostra.

Ao aplicar o potencial, cria-se um estado estacionário, onde os solutos formam zonas, e estas migram com velocidade constante e formam bandas de acordo com os valores decrescentes de mobilidade. A limitação deste modo é que se trata de uma técnica focada em separação de íons com a mesma carga, então se subdivide em isotacoforese aniônica e isotacoforese catiônica para as aplicações [17].

2.2. Eletroforese Capilar em Gel

Pode-se comparar esta abordagem com a clássica eletroforese em placas, mas sendo mais eficiente para quantificação, podendo haver automatização do processo e menor tempo de análise.

Esta técnica se baseia em preencher o capilar com uma matriz polimérica, e a separação se dá pelo impedimento do percurso dos analitos devido a diferenças de tamanho relativo, processo denominado peneiramento. Ela se aplica em moléculas iônicas de alta massa molecular, tais como fragmentos de DNA, proteínas, oligonucleotídeos, etc. [18]

2.3. Eletroforese Capilar de Zona

Considerada a mais universal das formas de eletroforese e também é conhecida como eletroforese capilar em solução livre. Neste modo, os analitos carregados se movem no capilar, passando pela janela de detecção em zonas distintas, e isso se deve a separação ser promovida pela diferença da mobilidade eletroforética de cada composto presente na amostra. Os fatores fundamentais para a separação neste caso são a homogeneidade da solução tampão, o pH do meio, a força iônica e a relação volume/carga do analito [17,19]. As aplicações deste tipo de eletroforese capilar se concentram em compostos carregados e/ou compostos que possuem diferenças significantes no volume molecular [17].

2.4. Eletrocromatografia Capilar

A eletrocromatografia capilar se baseia na migração de uma fase móvel conduzida pelo fluxo eletrosmótico pelo capilar e no uso de fases móveis e estacionárias típicas da cromatografia líquida; e assim fornece interações que promovem a separação. Pode-se concluir que trata de uma técnica híbrida, unindo a alta eficiência da eletroforese capilar com a alta seletividade da cromatografia líquida de alta eficiência [20].

Devido ao perfil radial do fluxo eletrosmótico, a eletrocromatografia capilar oferece eficiências maiores quando se trata de compostos carregados que a cromatografia líquida, que possui um perfil laminar de fluxo, pois une as características eletroforéticas com os efeitos de partição da cromatografia líquida; e para compostos neutros as duas técnicas tem seletividade muito similar ^[21,22].

2.5. Cromatografia Eletrocínética Micelar

Esta técnica é baseada no mecanismo de partição do soluto entre duas fases: a fase micelar e a fase aquosa (tampão) e essas fases se movimentam com diferentes velocidades de acordo com o transporte eletroforético. Neste meio os compostos com carga, são separados baseados na diferença da mobilidade eletroforética assim como na diferença de distribuições entre as fases, já os neutros são separados pelas diferentes distribuições entre as fases. O dodecilsulfato de sódio e o brometo de cetiltrimetilamônio são os tensoativos mais empregados na cromatografia eletrocínética micelar ^[6,23].

Ao utilizar o dodecilsulfato de sódio como tensoativo, a ordem de migração é inversa ao se comparar ao modo de zona, pois existe repulsão eletrostática entre o tensoativo e os ânions presentes na amostra. Moléculas neutras podem ser separadas por MEKC em função da hidrofobicidade. Os cátions são retidos mais fortemente no capilar devido a atração eletrostática entre as micelas do dodecil sulfato de sódio e a carga positiva do íon. E por fim, compostos muito hidrofóbicos permanecerão o tempo total de corrida no interior das micelas, sendo com elas eluídos. Assim, ordem de eluição dos componentes será primeiramente o fluxo eletrosmótico, seguido pelos solutos (onde a ordem de eluição dos mesmos é determinada pela partição que apresentam pela micela) e finalmente, a micela ^[23,24].

O coeficiente de distribuição e as velocidades da solução e da micela são os fatores determinantes da velocidade de migração dos compostos neutros. O analito que não interage com as micelas migra com a velocidade da solução (velocidade eletrosmótica), enquanto que, o totalmente incorporado na micela migra com a velocidade da mesma, já os analitos que estão parcialmente incorporados sofrem

ambos os efeitos; e graças a isso pode-se estabelecer uma ordem de migração baseada na contribuição de cada tipo de velocidade sobre o movimento do analito^[25].

O tempo de migração de um soluto neutro (t_r) é dado pela equação:

$$t_r = \frac{1+k}{1+k\frac{t_0}{t_{mc}}} t_0 \quad (10)$$

O tempo que um soluto não retido atravessa a coluna capilar até o detector é t_0 , enquanto o tempo que uma micela percorre o mesmo caminho é t_{mc} , definindo então um intervalo finito para os solutos retidos na solução, e por fim k trata-se do fator de retenção de um soluto. Os tempos podem ser determinados experimentalmente, assim, pode-se obter através de dados experimentais o valor do fator de retenção dos analitos do meio reajustando a equação acima:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0 \left(1 - \frac{t_r}{t_{mc}}\right)} \quad (11)$$

Os tempos de migração do fluxo eletrosmótico (t_0), o tempo de migração da micela (t_{mc}) e o tempo de retenção (t_r) são determinados pela velocidade do fluxo eletrosmótico, pela velocidade de migração da pseudo-fase micelar e pelas dimensões do detector (comprimento até o detector). E para a obtenção destes valores experimentais, são adicionados compostos como marcadores:

- t_0 : composto neutro hidrofílico que não interage com a micela tem a sua eluição com o fluxo eletrosmótico pode ser usado como marcador eletrosmótico;

- t_{mc} : compostos neutros muito hidrofóbicos são usados como marcadores da micela, porque, ao serem totalmente incorporados, eluem no mesmo tempo das micelas;

- t_r : próprio tempo do analito de interesse.

De uma maneira resumida, as separações são o resultado da combinação de efeitos na diferença de partição dos solutos entre as fases micelar e aquosa, assim como da diferença de mobilidade de espécies iônicas, e pode ser controlada principalmente pela concentração e composição química do tensoativo e outros aditivos como solvente orgânico e agentes complexantes ^[12,16,26].

3. REFERÊNCIAS

- [1] BAKER D.R., Capillary electrophoresis. New York: John Wiley, 1995; 244p.
- [2] BRODY J.R., KEM S. E., History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. Analytical Biochemistry, 333 (1), 2004; 1-13
- [3] CAMIRELLI P., Capillary electrophoresis: theory and practice. London: CRC Press, 1997; 553p
- [4] KNOX J.H., MCCORMACK K.A., Temperature effects in capillary electrophoresis 2: Some theoretical calculations and predictions. Chromatographia, 38, (3-4); 215-221
- [5] GROSSMAN P.D., COLBURN J.C. Capillary electrophoresis: theory and practice. New York: Academic Press, 1992; 349p.
- [6] TISSELIUS A., A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. Trans Faraday Society, 33, 1937; 524-531.
- [7] HJÉRTEN S., Free zone electrophoresis. Chromatography Review, 9, 1967; 122-219
- [8] KOWALSKI P., PLENIS A., Comparison of HPLC and CE methods for the determinations of cetirizine dihydrochloride in human plasma samples. Biomedical Chromatography, 21, 2007; 903-911
- [9] SOMBRA L.L., GÓMEZ M.R., OLSINA R., MARTÍNEZ L.D., SILVA M.F., Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in 'guarana' based phytopharmaceuticals. Pharmaceutical Biomedicine, 36, 2005; 989-994.
- [10] KAPPES T., HAUSER P.C., Detectors for Capillary Electrophoresis. Biochemistry, 2000;1239-1245
- [11] TAVARES M.F.M., Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. Química Nova, 19, 1996; 173-181
- [12] KUHN R.; HOFFSTETTER-KUHN S. Capillary Electrophoresis: Principles and Practice; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1993.
- [13] WESTON A., BROWN P.R. HPLC and CE: principles and practice. San Diego: Academic Press, 1997; 280p.

[14] LANDERS, J., Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques, Third Edition; Ed.; CRC Press, 2007.

[15] LI S.F.Y. Capillary Electrophoresis: principles, practice and applications. Amsterdam: Elsevier, 1993; 582p.

[16] DA COSTA J. L., Eletroforese Capilar Como Ferramenta Analítica Para Toxicologia Forense (tese de doutorado), **2008**.

[17] DELMOTE P., Capillary Isotacophoresis. J. Chromatography A, 165, 1979; 87-101

[18] TAVARES M.F.M., Mecanismos de separação em eletroforese capilar, Química Nova, 20, 1997; 493-511

[19] TONIN F. G., TAVARES M.F.M., Separation strategies for environmental analysis. In: Lander J.P. Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associate Microtechniques. Boca Raton: CRC Press, 3, cap. 31, 2008; 914-963

[20] JORGENSON J., LUKACS K.D., Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. Analytical Chemistry, 53,, 1981; 1298-1302

[21] MISTRYA K., KRULLA I., GRINBERG N., Capillary electrochromatography: an alternative to HPLC and CE. J. Sep. Sci, 25, 2002; 935-958

[22] TERABE S., OTSUKA K., ICHIKAWA K., TSUCHIYA A., ANDO T., Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. Analytical Chemistry, 56, 1984; 111-113

[23] TERABE, S. Twenty-Five Years of Micellar Electrokinetic Chromatography. Procedia Chemia, 2 (1), 2010; 2-8

[24] TERABE, S. Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography. Annu. Rev. Analytical Chemistry, 2 (1), 2009, 99–120.

[25] TERABE S., CHEN N., OTSUKA K., Micellar electrokinetic chromatography. Advanced Electrophoresis, 7, 1994, 87-153

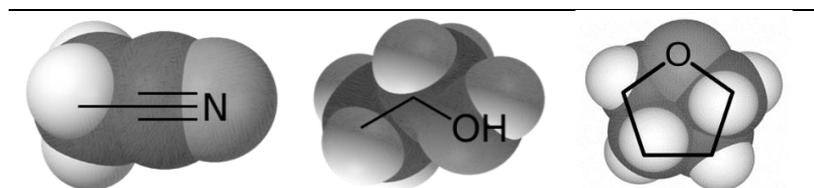
[26] WEINBERGER R., Practical Capillary Electrophoresis. New York: Academic Press, 2000; 310p.

CAPÍTULO III:
**ESTUDO DA SEPARAÇÃO
DE GLICOCORTICOIDES
VIA MEKC**

1. INTRODUÇÃO

No modo MEKC o parâmetro de separação mais importante é o tipo e concentração do agente tensoativo e no caso, dodecil sulfato de sódio (SDS) é o tensoativo mais frequentemente utilizado. A interação soluto-micela e, portanto, retenção do soluto, pode ser elegantemente manipulada pela adição de solventes orgânicos como aditivos ao eletrólito aquoso contendo a dispersão micelar ^[1].

Com base no triângulo de seletividade proposto por Snyder ^[2,3] foram eleitos como modificadores os solventes presentes na Figura 3.1. devido a suas diferentes propriedades de acidez, basicidade e tendências polares. Ao usar solventes com propriedades diferentes, há uma mudança no meio micelar, e assim há possíveis diferenças nas interações dos analitos com a micela.

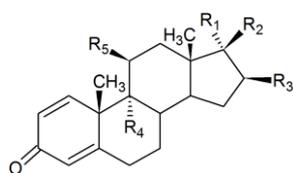


Solvente	Acetonitrila	Etanol	Tetrahidrofurano
Fórmula Molecular	C ₂ H ₃ N	C ₂ H ₆ O	C ₄ H ₈ O
A	0,07	0,37	0,00
B	0,319	0,48	0,481
ε	35,95	24,3	7,58

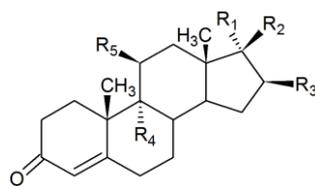
Figura 3.1. Solventes orgânicos utilizados. (A) média de acidez promovida por ligações de Hidrogênio; (B) média de basicidade promovida por ligações de Hidrogênio; (ε) constante dielétrica.

Os 17 glicocorticoides utilizados neste estudo são apresentados na Figura 3.1. e podem ser subdivididos em três grupos com base na estrutura destes compostos:

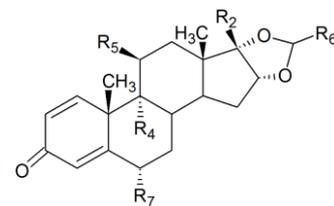
- 1 a 10: Estes apresentam no anel A do núcleo esteroide a presença de duas ligações duplas;
- 11 a 13: No caso destes existe a presença somente de uma ligação dupla no mesmo anel;
- 14 a 17: Similarmente ao primeiro grupo, estes possuem duas ligações duplas, porém se diferem pela presença de um quinto anel na estrutura, este heterogêneo com presença de oxigênio.



(a)



(b)



(c)

Glicocorticoide			R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
1	17-Valerato de Betametasona	a	COCH ₂ OH		CH ₃	F	OH	-	-
2	21-Acetato de Prednisolona	a	OH		-	-	OH	-	-
3	21-Hemisucinato de Prednisolona (sal de sódio)	a	OH		-	-	OH	-	-
4	Betametasona	a	OH	COCH ₂ OH	CH ₃	F	OH	-	-
5	Dexametasona	a	OH	COCH ₂ OH	CH ₃	F	OH	-	-
6	Dipropionato de Beclometasona	a	CH ₃ CH ₂ COO		CH ₃	Cl	OH	-	-
7	Furoato de Mometasona	a			CH ₃	Cl	OH	-	-
8	Prednisolona	a	OH	COCH ₂ OH	-	-	OH	-	-
9	Prednisona	a	OH	COCH ₂ OH	-	-	O	-	-
10	Propionato de Clobetasol	a	CH ₃ CH ₂ COO		CH ₃	F	OH	-	-
11	17-Valerato de Hidrocortisona	b		COCH ₂ OH	-	-	OH	-	-
12	21-Acetato de Cortisona	b	OH		-	-	O	-	-
13	Hidrocortisona	b	OH	COCH ₂ OH	-	-	OH	-	-
14	Amcinonida	c	-		-	F	OH		-
15	Budesonida	c	-	COCH ₂ OH	-	-	OH	(CH ₂) ₂ CH ₃	-
16	Fluocinolona Acetonida	c	-	COCH ₂ OH	-	F	OH	2 x (CH ₃)	F
17	Triamcinolona Acetonida	c	-	COCH ₂ OH	-	F	OH	2 x (CH ₃)	-

Tabela 3.1. Estrutura molecular dos glicocorticoides em estudo.

Visto as estruturas predominantemente hidrofóbicas, o uso do modo MEKC se mostra o melhor a ser aplicado, e junto com o auxílio dos solventes orgânicos citados, a separação dos analitos pode ser modulada com base num triângulo de misturas de tais solventes [4].

O uso dessa abordagem se baseia no conceito de cavitação provocada pelo solvente, que se resume na tendência de criar uma cavidade para alocar o soluto, e solventes com diferentes propriedades modificam tanto a micela quanto o meio externo da mesma, e desta forma afeta o equilíbrio soluto-micela-eletrólito. Para o modo micelar da eletroforese, as interações são baseadas em parâmetros de dispersão, indução, orientação e ligação; e estas são responsáveis pela localização do soluto, seja este migrando para a fase solvente ou para a fase pseudo-estacionária (micela) [5].

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo é a otimização da separação de 17 glicocorticoides utilizando MEKC. Para isto serão investigados de aspectos fundamentais envolvidos na migração eletroforética simultânea de diferentes glicocorticoides através da obtenção de medidas de retenção dos analitos de interesse com eletrólito modulado por solventes orgânicos em desenhos de misturas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamento e Método

Os experimentos foram conduzidos em um equipamento de eletroforese capilar (Beckman Coulter, PA 800 Plus, Fullerton, CA, USA) equipado com um detector de UV e o software para utilizado para aquisição de dados foi o 32 Karat™ (Beckman Coulter).

Foi utilizado capilar de sílica fundida revestida com poliamida de 75 μ m de diâmetro interno (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) com comprimento efetivo de 30,0cm (de comprimento total 40,2) para realização dos experimentos. Capilares no seu primeiro uso foram condicionados por lavagem com 1 mol.L⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH) por 30 min, posteriormente com água deionizada por 30 min e então com eletrólito por 30 min. E em cada dia de trabalho, inicialmente o capilar foi condicionado com 1 mol.L⁻¹ de NaOH por 5 min, seguido de água deionizada por 5 min e por fim com eletrólito por 10 min; entre as injeções, o capilar foi lavado com o uma mistura etanol/água 50% v/v por 1 minuto e eletrólito por 1 min; e ao final do dia de trabalho, lavado com a mistura etanol/água 50% v/v por 5 minutos, seguido por injeção de ar, para fim de secar o capilar.

E o método utilizado seguiu os parâmetros instrumentais da tabela abaixo:

Tabela 3.2. Parâmetros instrumentais.

Tensão	Detecção
Polaridade Positiva	UV-Vis
Constante	Modo direto
V=25kV	$\lambda=257\text{nm}$
Temperatura	Injeção da Amostra
Constante	Hidrodinâmica
T=20°C	P=0,5 psi
Repetição	t=3s
Triplicata	

3.2. Reagentes

Os reagentes utilizados eram de todos de classe analítica, dodecil sulfato de sódio (SDS) obtido da Sigma-Aldrich (Japan), tetraborato de sódio (TBS) da Riedel-de-Haen (Germany), água foi deionizada e purificada em um sistema de purificação de água Millipore Milli-Q Gradient® (USA); álcool etílico absoluto (EtOH), etraidrofurano (THF) acetonitrila da Labsynth (Diadema, SP).

3.3. Padrões

Os padrões de amcinonida, dipropionato de beclometasona, betametasona, 17-valerato de betametasona, budesonida, propionato de clobetasol, 21-acetato de

cortisona, dexametasona, fluocinolona acetonida, hidrocortisona, 17-valerato de hidrocortisona, furoato de mometasona, prednisolona, 21-hemisuccinato de prednisolona (sal de sódio), 21-acetato de prednisolona, prednisona, triamcinolona acetonida e antraceno; foram todos obtidos da Sigma-Aldrich Corporation (USA).

O preparo da mistura de glicocorticoides para trabalho era diário, e partiram da diluição de soluções estoque preparadas em álcool etílico absoluto na concentração de 2000 mg.L⁻¹ e mantidas em temperatura ambiente. Para o trabalho as soluções foram diluídas em SDS 6 mmol.L⁻¹/TBS até uma concentração de 100 mg.L⁻¹, enquanto que a concentração do marcador de tempo de migração da micela (antraceno) utilizada foi de 50 mg.L⁻¹.

3.4. Eletrólitos

Houve o preparo de um total de 10 (dez) diferentes tipos de eletrólitos seguindo o modelo simplex centroide para determinar as composições (Figura 3.2). Estes eletrólitos foram compostos igualmente por 30 mmol.L⁻¹ de SDS em 20 mmol.L⁻¹ de TBS (pH 9,3; tampão) e solventes com propriedades distintas foram utilizados e diferente composição porcentual foram utilizados como aditivos.

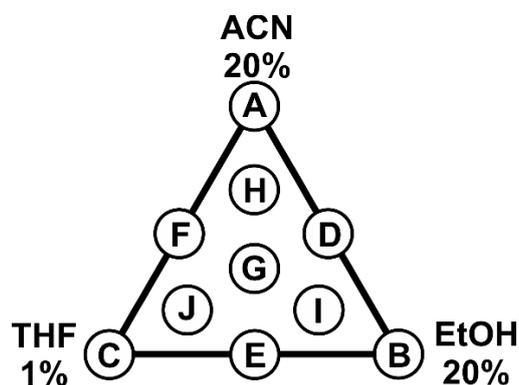


Figura 3.2. Triângulo de Mistura de Solventes

Primeiramente, três eletrólitos com solvente puro (20% de EtOH, 20% de ACN ou 1,0% de THF) foram preparados. Partindo da mistura das soluções com um único solvente (pontos A, B e C) foram obtidos meios com combinação binária de solventes (pontos D, E e F), contendo combinações de 10% de cada solvente no eletrólito (exceto para THF a 0,5%) e misturas ternárias (ponto G) onde havia 6,6% cada

solvente (exceto THF a 0,34%), ou combinações de três solventes (pontos H, I e J) a 13% ou 3,3% (exceto THF em 0,65% ou 0,17%).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com base nas características dos solventes apresentados por Snyder [2], as seguintes características acerca dos mesmos devem ser consideradas para melhor entendimento da separação simultânea obtida dos glicocorticoides:

- I) Acetonitrila: solvente aprótico, com uma grande capacidade receptora de elétrons, e esta característica proporciona um alto valor de basicidade por ligações de hidrogênio ($B=0,319$), acidez tendendo a zero ($0,07$) e um alto valor de constante dielétrica ($\epsilon=35,95$);
- II) Etanol: solvente prótico, com capacidade de participar de ligações de hidrogênio tanto como acceptor quanto como doador de prótons, e esta característica o proporciona altos valores de acidez por ligações de hidrogênio ($A=0,37$) e de basicidade por ligações de hidrogênio ($B=0,48$), além de uma constante dielétrica moderadamente elevada ($\epsilon=24,30$);
- III) Tetrahidrofurano: também um solvente aprótico, mas devido a presença de oxigênio na sua estrutura, o qual tem dois pares de elétrons livres, seu valor de basicidade ($B=0,48$) supera o da acetonitrila, sua acidez é igual a zero ($A=0,00$) e apresenta uma baixíssima constante dielétrica ($\epsilon=7,58$).

As Figuras 3.4. e 3.5., apresentam os eletroferogramas obtidos para cada meio estudado, solventes puros, misturas binárias e sistemas ternários, respectivamente.

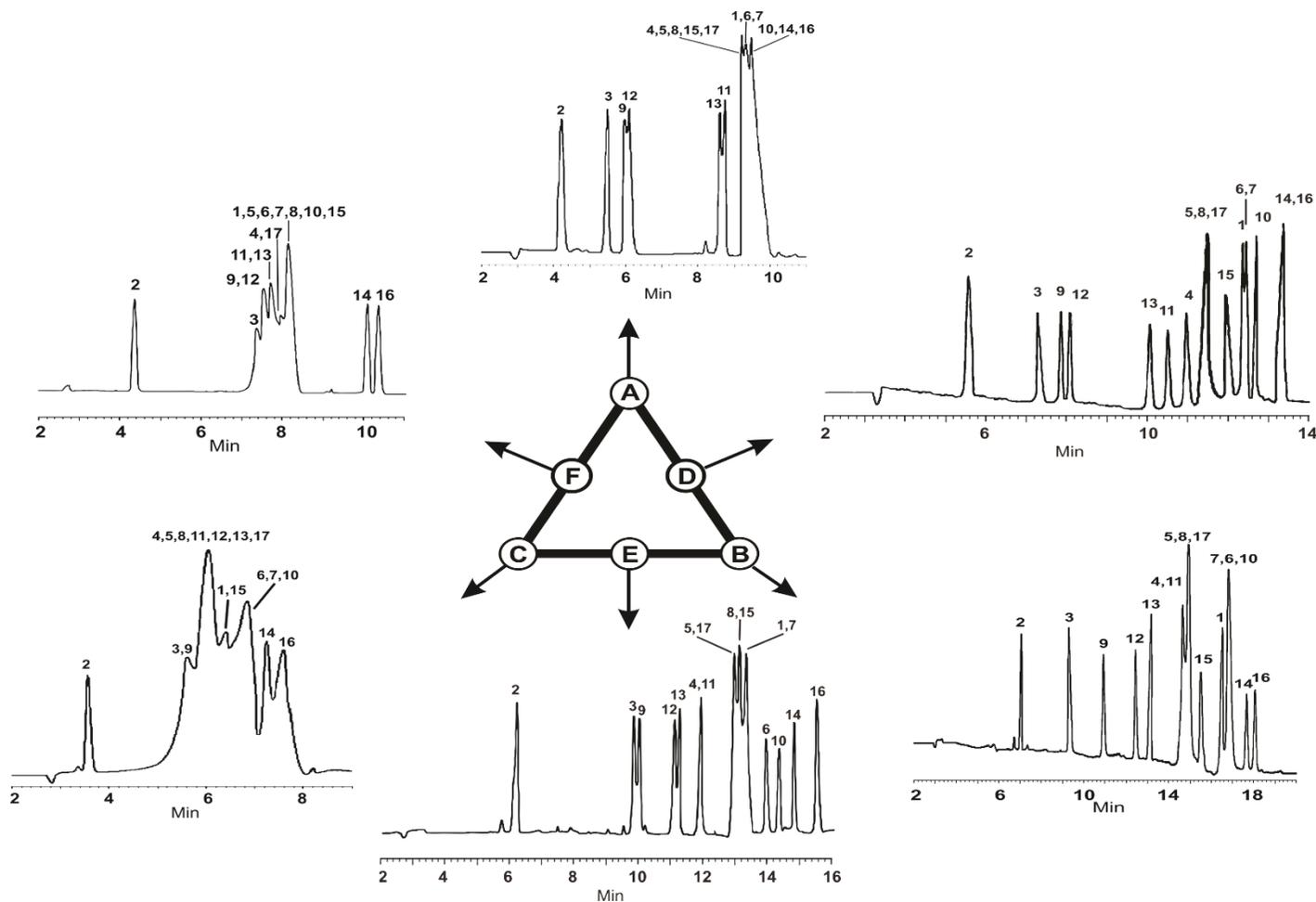


Figura 3.4. Otimização da separação. Eletrólito base: 30 mmolL⁻¹ SDS 20 mmolL⁻¹ TBS e uma porcentagem de solvente orgânico. Misturas ternárias: Solvente único: A) 20% ACN, B) 20% EtOH e C) 1% THF. Mistura binária: D) 10% ACN + 10% EtOH, E) 10% EtOH + 0,5% THF e F) 10% ACN + 0,5% THF. Condição eletroforéticas: tensão aplicada: +25kV, temperatura constante: 20°C, detecção UV direta: 257nm, injeção da amostra hidrônica: 0,5 psi. Misturas dos glicocorticoides: concentração de 100 mg.L⁻¹ cada (estoque preparado em meio metanol), diluído em 6 mmolL⁻¹ SDS 4 mmolL⁻¹ TBS.

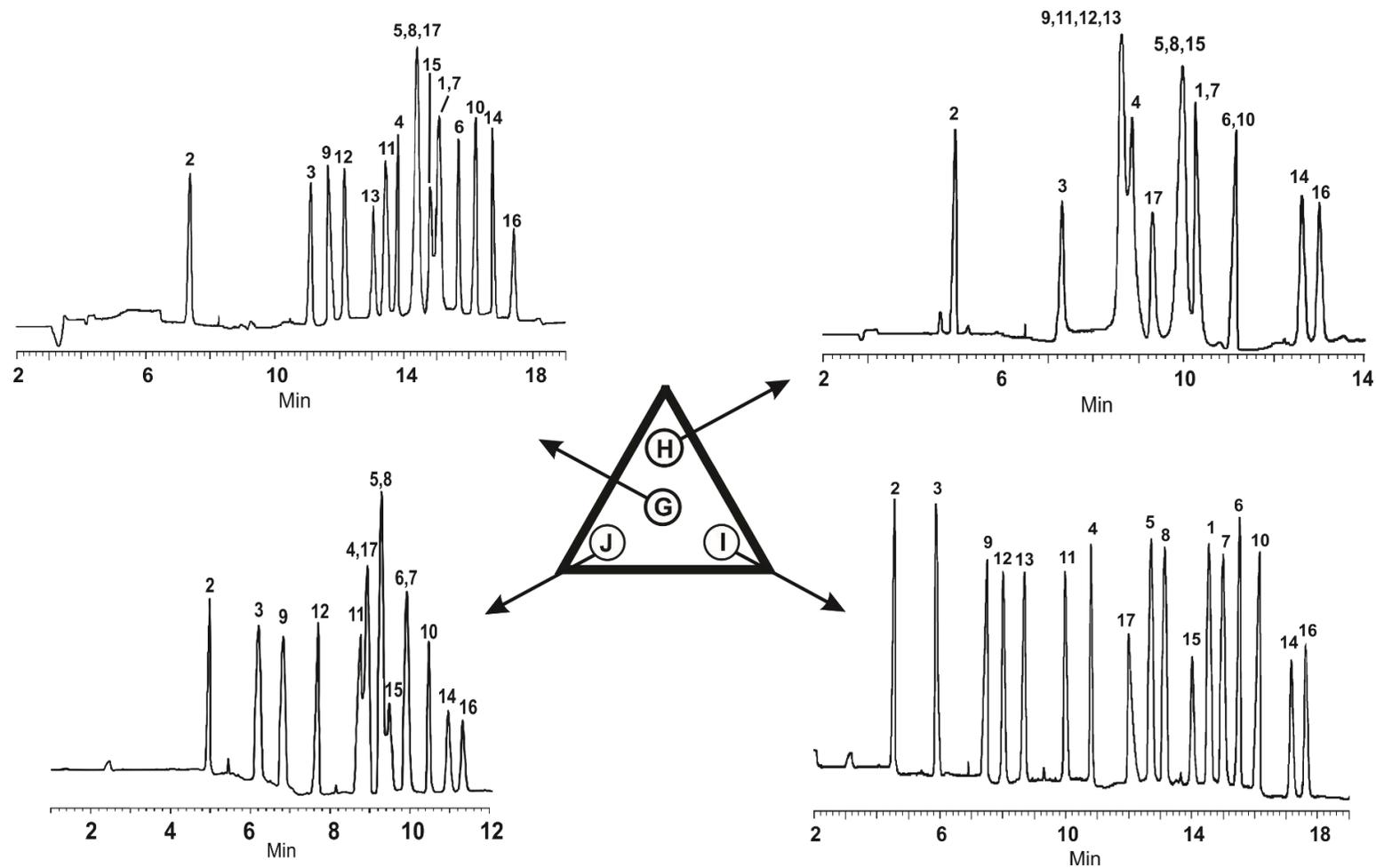


Figura 3.5. Otimização da separação. Eletrólito base: 30 mmol^{-1} SDS 20 mmol^{-1} TBS e uma porcentagem de solvente orgânico. Misturas ternárias: G) 6,7% ACN + 6,7% EtOH + 0,34% THF, H) 13,3% ACN + 3,3% EtOH + 0,17% THF, I) 3,3% ACN + 13,3% EtOH + 0,17% THF e J) 3,3% ACN + 3,3% EtOH + 0,67% THF. Condição eletroforéticas: tensão aplicada: +25kV, temperatura constante: 20°C , detecção UV direta: 257nm, injeção da amostra hidrônica: 0,5 psi. Misturas dos glicocorticoides: concentração de $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cada (estoque preparado em meio metanol), diluído em 6 mmol^{-1} SDS 4 mmol^{-1} TBS.

4.1. Comportamento Eletroforético e Efeito do Solvente

A ordem de migração dos analitos se manteve constante, e esta será discutida para a série estudada.

O glicocorticoide mais hidrofílico é o 17-valerato de betametasona (2), pois este apresenta uma enorme capacidade de ligações de hidrogênio visto a presença de pares de elétrons livres provenientes das hidroxilas e do grupamento éster de sua estrutura, o seguinte, 21-Acetato de prednisolona em forma de sal sódico (3) possui carga na estrutura, e assim a migração é facilitada no modo MEKC conduzido a tensão de + 25kV, já os compostos 9 e 12 (prednisona e 21-Acetato de Cortisona) apresentam carbonila na estrutura, e graças a isso, um efeito mais básico é evidenciado, e com isso uma maior propensão a interações com o solvente orgânico presente no meio através de ligações de hidrogênio, e a diferença entre de ordem entre estes pode ser vista pelo volume do substituinte R₂, sendo o mais volumoso retardado no processo, em seguida, hidrocortisona (13) e 17-Valerato de Hidrocortisona (11), neste caso não há presença de carbonila e sim hidroxila como substituinte e comparado com o caso anterior, refere menor interação com o solvente orgânico, e a ordem dos mesmos se justifica também pelo volume no substituinte, mas neste caso no R₁, e assim o composto 11 fica mais retido que o 13, para os corticoides 4,17 e 5 a presença de flúor na estrutura confere uma polarizabilidade central ajudando na interação com o solvente, uma interação similar que justifica estes migrarem em conjunto, a prednisolona (8) tem um acesso a ligações de H pelo grande número de hidroxilas como substituinte, e assim as interações deste tipo são facilitadas, e por fim, o último grupo de compostos (glicocorticoides 15, 17, 6, 10, 14 e 16) se apresentam no final da série pela suas características hidrofóbicas mais predominantes, e principalmente pelo volume molecular dos mesmos, assim comparados aos outros esteroides tendo uma retenção maior.

Por mais que a ordem de migração não tenha sido alterada, os solventes orgânicos mudaram drasticamente a seletividade do meio, e a separação pode ser completa somente na condição I, a qual tem o segundo maior tempo de corrida e composição de solvente de 13,3% EtOH, 3,3% ACN e 0,17% THF.

Para justificar este comportamento ao pensar no cunho da ação do solvente, as interações de acidez e basicidade se mostram contribuir na separação mas não

tanto, visto que em meios onde há maior concentração de THF, solvente mais apolar presente, há uma separação menos eficiente, e pode-se prever que tal efeito se deve a uma menor inserção do soluto dentro da micela e maior dispersão no eletrólito, conforme solventes mais polares são adicionados, os glicocorticoides buscam se alocar na micela e assim havendo diferenciação das mesmas devido a suas estruturas, pois o volume ocupado difere. Então volumes maiores de solvente mostram um melhor resultado e nos meios com mais etanol, o qual tem a propriedade de reduzir o volume micelar, por a micela ter um espaço menor, o volume ocupado pelo hormônio se torna mais relevante e graças a isso há formação de agregado soluto-micela com diferentes perfis e por fim diferentes tempos de migração.

4.2. Aplicação do método

Os níveis de corticoides na urina podem ser de importante aplicação no controle terapêutico, visto que tais compostos causam efeitos colaterais severos, e principalmente se mostra útil nos casos de pacientes que os utilizam de forma contínua. Para demonstrar a aplicabilidade, um método analítico proveniente da otimização da separação dos corticoides foi utilizado num teste de identificação de prednisona em amostra de urina.

A condição ótima de separação (30 mmol L⁻¹ SDS, 20 mmol L⁻¹ TBS, 13,3% EtOH, 3,3% ACN, 0,17% THF, e pH 9,3) foi aplicada num extrato de urina obtida de um paciente do sexo masculino que faz uso contínuo de prednisona, dosagem de 20 mg/dia. O preparo da amostra se baseou na metodologia de proposto por Djedovic e Rainbow ^[5] para detecção de glicocorticoides sintéticos, e se baseia em coletar uma alíquota de urina e realizar extração líquido-líquido utilizando diclorometano. Para o estudo em questão, a alíquota coletada foi de 250 µL, então extraída com 1 mL de diclorometano que é evaporado, e por fim sendo adicionado o extrato 1mL do eletrólito de trabalho.

O resultado está apresentado na Figura 3.6. e assim demonstrando a potencial aplicabilidade do método em um exame clínico para tal hormônio.

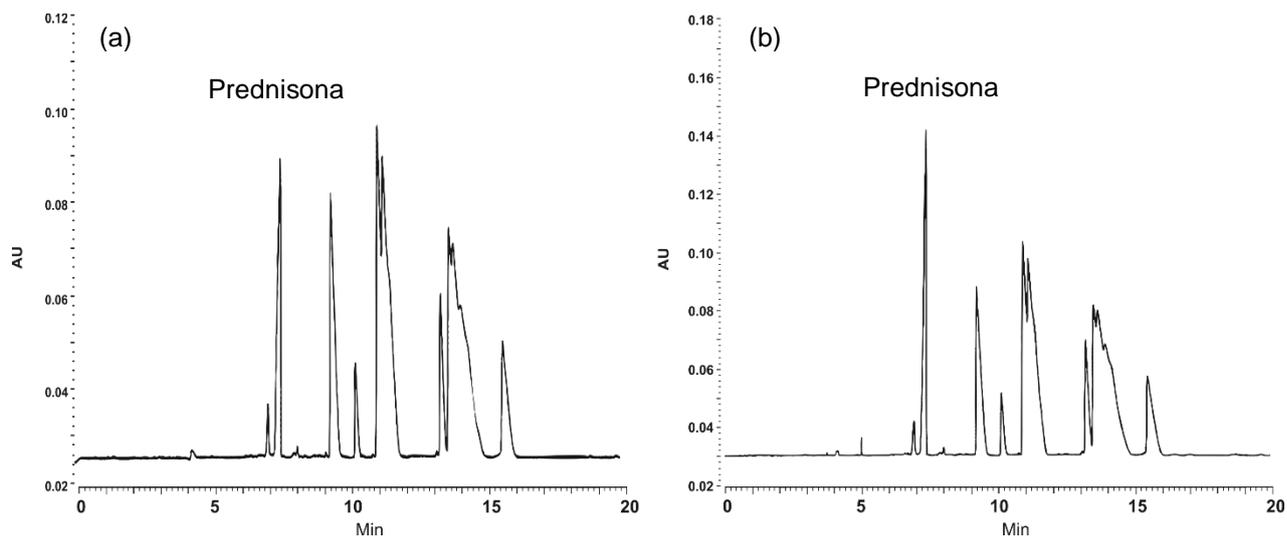


Figura 3.6. Eletroferogramas do extrato da urina de um voluntário que faz uso contínuo de prednisona (a) e extrato dopado com 50 mg L⁻¹ de padrão (b).

Injeções repetitivas e análises inter-dia forneceram valores de C.V. apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Valores de C.V. para a aplicação em urina.

	Repetição (n=5)	Precisão inter-dia (3 dias x 3 injeções)
Tempo de migração	1%	3%
Área de pico	1.1%	3,4%

5. CONCLUSÃO

Este trabalho evidencia que a interação que rege a separação destes compostos se baseia na capacidade do meio de alocar os analitos na micela e assim mudar sua forma, os efeitos de basicidade e acidez, assim como seu efeito no deslocamento da carga total da também contribuem para a separação, mas o principal fator é o volume que o glicocorticoide ocupa na micela, assim modificando sua estrutura.

Detalhes maiores podem ser obtidos através da análises de descritores dos analitos e são apresentados no próximo capítulo, parâmetros estruturais destes compostos são comparados com os meios estudados e assim uma elucidação e compreensão maior das forças que regem a separação ficam mais evidentes.

A metodologia proposta se mostrou excelente. O ótimo de separação de todos os glicocorticoides na linha de base foi obtido em menos de 20 minutos, assim fazendo com que o método possa ser aplicado na distinção dos analitos estudados; e com base nessa afirmação uma aplicação em urina se mostrou interessante para demonstração da capacidade do método.

A aplicação da metodologia para a amostra de urina foi adequada. Através da comparação entre o extrato de urina e a amostra dopada com padrão analítico evidenciou-se a ampliação do sinal de absorbância do pico correspondente a prednisona, além disso os demais picos provenientes do efeito matriz de mantiveram praticamente inalterados, deste modo mostrando boa seletividade para esta análise, além disso, os baixos valores de CV para ensaios intra-dia e injeções repetitivas demonstra uma confiabilidade na detecção do glicocorticoide alvo.

6. REFERÊNCIAS

[1] TERABE S., MEKC belongs to a mode of CE but also to micro-LC, *Analytical Chemistry*, 2004; 214-246

[2] SNYDER L.R., Classification of the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatography A*, 92 (1),1974; 223-230

[3] SNYDER L.R., CARR P.W., RUTAN S.C., Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. *Journal of Chromatography A*, 656 (1-2), 1993; 537-547

[4] LI Y., CUI S., CHENG Y., CHEN X., HU Z., Application of nonaqueous capillary electrophoresis for quantitative analysis of quinolizidine alkaloids in Chinese herbs. *Analytica Chimica Acta*, 508 (1), 2004;17-22

[5] TONIN F.G., JAGER A.V., MICKE G.A., FARAH J.P.S., TAVARES M.F.M., Optimization of the separation of flavonoids using solvent-modified micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 26 (17), 2005; 3387-3396

[6] DJEDOVIC N.K., RAINBOW S.J., Detection of synthetic glucocorticoids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in patients being investigated for Cushing's syndrome. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, 48 (6), 2011; 542-549

CAPÍTULO IV:
**QSRR -
APLICADO
A GLICOCORTICOIDES**

1.1. QSRR e os Hormônios Esteroidais

Os esteroides, a despeito de sua grande hidrofobicidade, resultado de seu núcleo esteroide, interagem com membranas biológicas permeando estruturas como a célula e os núcleos celulares. O hormônio ao se inserir na bicamada fosfolipídica acessa um meio altamente hidrofóbico, o qual aparentemente seria energeticamente favorável, porém nas extremidades da molécula se tem sítios polares (constituídos de oxigênios) e devido a isto a molécula também apresenta característica hidrofílica que causa uma interação desfavorável no meio me questão, e assim a molécula sai deste meio, e visto que energeticamente é muito similar o composto sair deste meio tanto pelo curso de entrada da bicamada lipídica quanto pelo outra direção da bicamada, uma fração de hormônio retorna para o meio o qual estava inicialmente, porém uma outra fração avança para o meio do outro lado desta camada [1,2].

O fenômeno de atravessar estas estruturas se chama *flip-flop* e a realização do estudo das interações intermoleculares envolvendo estas estruturas é portanto de grande importância. A sua incorporação micelar pode ser usada como modelo simples para elucidar tal comportamento [3-5].

Medidas precisas de mobilidade utilizando cromatografia eletrocínética micelar avaliam a energia livre de sua transferência entre solução homogênea e as micelas [6]. A existência de correlações entre descritores moleculares e coeficientes de retenção visam quantificar a importância das várias interações que ocorrem [7-8].

Descritores moleculares são bastante utilizados para apresentar uma razoável capacidade de previsão, por outro lado, também avaliam um outro conjunto de influências, sendo composto por interações como de ponte de hidrogênio, polarizabilidade e dipolaridade, por exemplo, e assim dificultando a interpretação das correlações obtidas. Mais recentemente o uso de descritores baseados em cálculo quântico (cargas atômicas parciais, e áreas de acesso do solvente) e aqueles baseados em cálculos de dinâmica molecular (simulação) têm mostrado mais detalhes desta interações hormônio-micela [9].

O estudo de separações de hormônios variando a composição do solvente em meio micelar também permite inferir sobre correlações onde ao invés dos descritores dos solutos são os parâmetros do solvente são utilizados, auxiliando na

elucidação desta incorporação. Uma das questões interessantes que este enfoque permite estudar trata da “localização” do soluto na estrutura micelar que passa então a ser escrutinada não pelo modelo simples da “gota de óleo” mas de uma estrutura mais complexa com miolo hidrofóbico, camada de hidratação das cabeças e superfície micelar [10-11].

O termo relações quantitativas estrutura-retenção (QSRR, do inglês *Quantitative Structure–Retention Relationships*) descreve estatisticamente relações derivadas entre parâmetros de retenção e descritores. Trata-se de relações lineares de energia livre de solvatação (LSER, do inglês *Linear Solvation Energy Relationships*), onde descritores estruturais dos solutos são incorporados no modelo. LSER são correlações que buscam descrever o processo de solvatação e transferência de solutos entre duas fases levando-se em conta variáveis termodinâmicas, onde cada variável é intencionalmente construída de modo a responder por uma característica específica. A solvatação do soluto é explicada por três diferentes tipos de interações intermoleculares: a) hidrofóbicas: as quais descrevem a formação da cavidade para alocação do soluto no meio solvente, b) polares: descrevem interações dipolares e de polarizabilidade no meio e c) acidez (capacidade doadora de ligações de hidrogênio) ou basicidade (capacidade receptora de ligações de hidrogênio: descrevem possíveis ligações de hidrogênio [12].

QSRR é definida pela expressão geral:

$$\log k = f_{linear}(\text{descritores})$$

Onde k é o fator de retenção obtido experimentalmente.

2. OBJETIVO

Encontrar quais são os descritores que regem a separação de glicocorticoides utilizando as informações obtidos experimentalmente no capítulo anterior. A retenção dos analitos, medidas do fluxo eletrosmótico e mobilidade da micela em função das condições serão os dados base para esta determinação.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Para a obtenção de maiores dados sobre a separação dos padrões discutida no capítulo anterior, o antraceno foi introduzido (como marcador micelar), no mix de padrões os quais a separação foi estudada. Para marcação do fluxo foi utilizado o metanol já presente nas soluções estoque de glicocorticoides.

Para cálculo dos descritores, as geometrias de equilíbrio dos confôrmeros mais estáveis para cada composto dos glicocorticoides estudados foram determinadas. Após, foram calculadas cargas atômicas parciais e áreas de acesso do solvente. Baseados nestes dados, várias relações carga-área foram derivadas.

Os seguintes softwares, foram utilizados: Spartan v5.1 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, U.S.A.), Amsol v7.1 (escrito por G.D. Hawkins, D.J. Giesen, G.C. Lynch, C.C. Chambers, I. Rossi, J.W. Storer, J. Li, J.D. Thompson and P. Winget, University of Minnesota, Minneapolis, MN, U.S.A.) e GEPOL93 v8 (escrito por J. L. Pascual-Ahuir, E. Silla and I. Tunon, University of Valencia, Burjassot, Valencia, Spain).

Os modelos de QSRR foram construídos através de regressões lineares simples e múltiplas de $\ln k$ versus descritores. A escolha dos descritores para o modelo foi realizada utilizando o pacote *leaps* (função *regsubsets*) do software R (<http://www.r-project.org/>). Essa função busca para ambas as regressões, os descritores que mais se correlacionam com $\ln k$. Na regressão múltipla, a procura dos dois melhores descritores para o modelo foi realizada até que fossem encontrados dois descritores não correlacionados entre si.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As misturas de solventes estudadas neste trabalho afetam a solubilidade dos hormônios na fase aquosa, variando entre 1 e 20% do volume total. Também a estrutura micelar é bastante afetada, principalmente na camada de solvatação. De um modo geral o etanol incorpora na micela de forma conjugada como seus monômeros, assim aumentando a capacidade de fazer ligações de hidrogênio na camada de

solvatação, sítio onde se espera que os hormônios incorporem. Isto favorece as interações com as carbonilas dos hormônios já que sem etanol não conseguem competir pela água com o sulfato, muito mais básico. A acetonitrila não incorpora tanto quanto etanol na fase micelar e seu efeito é maior na solubilização em fase aquosa. A quantidade de tetrahidrofurano utilizada não altera a micela, mas aumenta muito a desestruturação da água, ajudando a solvatar os solutos na fase aquosa.

Os resultados das correlações são apresentados na Tabela 4.1. onde uma tentativa de racionalização consistiu em agrupar as misturas pela acidez e basicidade dos cossolventes (ou seus valores de alfa, acidez por ligações de hidrogênio, e beta, basicidade por ligações de hidrogênio), sendo o primeiro grupo com uma tendência maior de doador de prótons, o segundo uma tendência receptora de prótons, terceiro, apesar da capacidade receptora de prótons existir, a presença de solvente orgânico é muito baixa, então o comportamento pode ser aproximado a de um meio sem solvente. Outras propriedades como energia de cavitação ou energia de coesão (delta de Hildebrandt) não foram levadas em conta já que as percentagens de tetrahidrofurano foram sempre pequenas.

Tabela 4.1: Efeitos do solvente na separação baseada na regressão linear múltipla do fator de retenção, log k, versus descritores.

Condição	Descritores	Q2
20% EtOH	SrcO, SrcH, SmaH	0.9272
10% ACN, 10% EtOH	SrmO, ScO, MaxcH	0.9536
3% ACN, 13% EtOH, 0,2% THF	RelacO, SrcO, DM_hybZ	0.9772
10% EtOH, 0,5% THF	SrmH, SrcO, SmaH	0.9615
7% ACN, 7% EtOH, 0,3% THF	SrcO, SmO, ScH	0.9385
3% ACN, 3% EtOH, 0,7% THF	RelaTcO, SrcO, SmO	0.9320
20% ACN	SrmO, ScO, MaxcH	0.8876
13% ACN, 3% EtOH, 0,2% THF	RelatmO, SrcO, SmO	0.7968
10% ACN, 0,5% THF	SrmO, ScO, MaxcH	0.7022
1% THF	SrcO, DM_hybZ, LDOS	0.9625

Q2: coeficientes de correlação de previsibilidade (validação LOO, Leave one out).

Abreviaturas dos descritores: SrcO, somatória relativa de cargas CM2 de Oxigênio, SrcH, somatória relativa de cargas CM2 de Hidrogênio, SmaH, somatória de carga Mulliken vezes área de Hidrogênio, SrmO, somatória relativa de cargas Mülliken de Oxigênio, MaxcH, máxima carga CM2 de hidrogênio, RelacO, somatória de cargas CM2 de Oxigênio sobre a área de Oxigênio, DM_hybZ, componentes do dipolo, SrmH, somatória relativa de cargas Mülliken de Hidrogênio, SmO, somatória de carga Mülliken de Oxigênio, ScH, somatória de cargas CM2 de Hidrogênio, RelaTcO, somatória de cargas CM2 de oxigênio sobre a área total da estrutura, RelatmO, área relativa de Oxigênio de máxima carga Mülliken, LDOS, densidade local de estados.

Assim em 1% de THF o descritor de hidrofobicidade foi a densidade local de estados do HOMO-1 (LDOS) e os polares foram a somatória das cargas dos oxigênios relativa à área total dos oxigênios da molécula e o momento de dipolo (SrcO e DM_hybZ), refletindo a pouca diferenciação de interações específicas de ponte de hidrogênio no meio aquoso:

$$\ln k = 0.3 \pm 0.2 + 1.1 \pm 0.2(248) \text{ LDOS} - 0.39 \pm 0.07(249) \text{ DM_hybZ} - 5.8 \pm 0.3(5) \text{ SrmO}$$

enquanto que em 20% de EtOH a hidrofobicidade é trocada pela somatória de áreas de H e somatória de cargas CM2 de H relativa à área total de H e a componente polar é a mesma (SrmO por SrcO, só mudando carga Mülliken por CM2), evidenciando a importância das interações na micela encharcada com etanol:

$$\ln k = -14 \pm 2 + 0.59 \pm 0.05(48) \text{ SmaH} - 26 \pm 3(70) \text{ SrcH} - 7.1 \pm 0.9(70) \text{ SrcO}$$

Os três grupos mostram nuances deste comportamento, mostrando que análises mais detalhadas necessitam de melhorias nas resoluções das separações e variação de temperatura para obtenção de parâmetros termodinâmicos de transferência meio aquoso – micela.

5. CONCLUSÃO

Foram encontrados os descritores para os 3 grupos de solventes, os quais apresentam comportamento distintos. Os solventes com características polares os dois descritores que apresentaram maior efeito foram a somatória relativa das cargas de oxigênio (SrcO) e a componente de dipolo (DM_hybZ). Para o solvente com característica predominante apolar, o descritor baseado na densidade local dos estados (LDOS).

As rígidas estruturas dos glicocorticoides separam duas regiões polares (anel A, com a carbonila conjugada, de carácter aprótico e anel D, geralmente mais hidrofílico e prótico – exceto mometasona, amcinonida e clobetazol). Assim as informações contidas nos descritores essencialmente hidrofóbicos e hidrofílicos são sempre relevantes e contribuem parcialmente nas correlações.

A importância relativa destes descitores vai depender do grau de penetração na camada de solvatação das micelas e da solvatação preferencial no solvente. A isto soma-se a diferença de hidrofobicidade entre as duas faces das moléculas, sugerindo alguma direcionalidade ou anisotropia tanto na incorporação micelar quanto na solvatação preferencial.

6. REFERÊNCIAS

[1] BENNET W.F., MACCALLUM J.L., HINNER M.J., MARRINK S.J., TIELEMANN D. P., Molecular View of Cholesterol Flip-Flop and Chemical Potential in Different Membrane Environments. *Journal of the American Chemical Society*, 131 (35), 2009; 12714–12720

[2] PARISIO G., SPEROTTO M.M., FARRARINI., Flip-Flop of Steroids in Phospholipid Bilayers: Effects of the Chemical Structure on Transbilayer Diffusion. *Journal of the American Chemical Society*, 134 (29); 12198-12228

[3] SCRIMIN P., TECILLA P., Model membranes: developments in functional micelles and vesicles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3 (6), 1999; 730-735

[4] BARCLAY L. R C., LOCKE S.J., MACNEIL J.M., VANKESSEL J., BURTON G.W., INGOLD K.U., Autoxidation of micelles and model membranes. Quantitative kinetic measurements can be made by using either water-soluble or lipid-soluble initiators with water-soluble or lipid-soluble chain-breaking antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 106 (8); 2479-2481

[5] SANDERS C.R., PROSSER R.S., Bicelles: a model membrane system for all seasons? *Ways & Means*, 6 (10), 1998; 1227-1234

[6] RUIZ-ÁNGEL M.J., TORRES-LAPASÍO J.R., GARCÍA-ÁLVAREZ-COQUE M.C., Retention Mechanisms for Basic Drugs in the Submicellar and Micellar Reversed-Phase Liquid Chromatographic Modes. *Analytical Chemistry*, 80 (24) 2008; 9705-9713

[7] KALISZAN R., Chromatography and capillary electrophoresis in modelling the basic processes of drug action. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18 (6), 1999; 400-410

[8] BAHER E., FATEMI M.H., KONOZ E., GOLMOHAMMADI H., Prediction of retention factors in micellar electrokinetic chromatography from theoretically derived molecular descriptors *Microchim Acta*, 158, 2007; 117- 122

[9] GANAN j., MORANTE-ZARCERO S., SIERRA I., Influence of Organic Modifier Additives to Separate Steroids by Micellar Electrokinetic Chromatography:

Determination of Solute-Micelle Association Constants at Different Acetonitrile Concentrations. *Analytical Letters*, 47 (9), 2014; 1513-1527

[10] MARRINK S.J., MARK A.E., Molecular Dynamics Simulations of Mixed Micelles Modeling Human Bile. *Biochemistry*, 41 (17), 2002; 5375-5382

[11] GHAFOURIAN T., FOOLADI S., The effect of Structural QSAR Parameters on Skin Penetration. *International Journal of Pharmaceutics*, 214, 2001; 1-11

[12] MORAES E.P, TRONIN F. G. DIAS L. G. , FARAH J. P. S, TAVARES. M. F. M; Assessment of Solute-micelle Interactions in Electrokinetic Chromatography using Quantitative Structure-retention Relationships. *Chemometric Methods in CE*. Wiley, 2010;345–366.

CAPÍTULO V:
**DESENVOLVIMENTO DE
MÉTODO PARA ANÁLISE DE
GLICOCORTICOIDES
EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS**

1. INTRODUÇÃO

Os glicocorticoides são de grande importância na medicina, suas aplicações merecem destaque devido sua enorme capacidade anti-inflamatória e imunomoduladora. Devido a estas características foram sintetizados pela indústria farmacêutica com a finalidade de potencializar estas ações ou aumentar meia-vida biológica, por exemplo [1]. A tabela 5.1. mostra um comparativo do incremento da potência destes análogos sintéticos quando comparados ao cortisol, o glicocorticoide naturalmente presente nos animais.

Tabela 5.1. Características farmacocinéticas e farmacodinâmicas de alguns glicocorticoides de uso clínico. Adaptado de Galofré [1] e Oliveira [2].

Glicocorticoide	Potência relativa	Dose equivalente (mg)	Meia vida plasmática (min)	Duração da ação (h)
Cortisol	1	20	80	8-12
Prednisona	3,5-4	5	60	12-36
Triamcinolona	5	4	200	12-36
Betametasona	25	0,6	300	36-72
Dexametasona	25-40	0,5	300	36-72
Beclometasona	100	0,2	30	12-36
Mometasona	100	0,2	180	36-72

Porém devido a diferentes fármacos conterem glicocorticoides, sejam na forma de comprimidos anti-inflamatórios, pomadas para alergia e prurido, colírios para irritação ocular, por exemplo; e haver um livre comércio dos mesmos, eles se tornam perigosos, pois seus efeitos colaterais são gravíssimos, tais como, osteoporose, retenção de líquidos, desordens metabólicas entre outros [3]. Com base nessas afirmações, a indústria farmacêutica necessita de metodologias capazes de quantificar os teores destes princípios ativos, pois pequenas mudanças na composição dos fármacos podem acarretar em efeitos colaterais indesejados [4].

A Eletroforese capilar é uma das técnicas de separação analítica que merece destaque devido a sua alta eficiência na separação de substâncias neutras como iônicas. Desta forma houve um aumento significativo no uso da eletroforese capilar para a separação de formulações farmacêuticas e biomoléculas nas últimas décadas. Com o crescente número de análises de moléculas neutras por eletroforese capilar

foram desenvolvidos eletrólitos e capilares modificados e isto tem se mostrado de grande interesse na difusão desta técnica analítica [5-9].

Em levantamentos recentes na literatura foram encontrados poucos relatos da determinação de esteroides por eletroforese capilar. E os glicocorticoides, especificamente, são atualmente uma das classes de fármacos mais prescritas no mundo [10]. Neste sentido, há necessidade desenvolver metodologias específicas para o controle de qualidade destas formulações.

2. OBJETIVO

O alvo deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de uma metodologia para determinação de glicocorticoides em formulações farmacêuticas utilizando eletroforese capilar micelar com injeção inversa. Tal método buscou ser de curto tempo de análise, simples, específico, exato e preciso para a determinação de prednisona, betametasona, furoato de mometasona e dipropionato de beclometasona em formulações farmacêuticas disponíveis comercialmente.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Condições instrumentais

Os experimentos foram conduzidos em um equipamento de eletroforese capilar (Beckman Coulter, PA 800 Plus, Fullerton, CA, USA) equipado com um detector de UV e o software para utilizado para aquisição de dados foi o 32 Karat™ (Beckman Coulter).

Foi utilizado capilar de sílica fundida revestida com poliamida de 75µm de diâmetro interno (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) com comprimento total de 40,2 cm para realização dos experimentos. Capilares no seu primeiro uso foram condicionados por lavagem com 1 mol.L-1 de hidróxido de sódio (NaOH) por 30 min, posteriormente com água deionizada por 30 min e então com eletrólito por 30 min. E em cada dia de trabalho, inicialmente o capilar foi condicionado com 1 mol.L-1 de NaOH por 5 min, seguido de água deionizada por 5 min e por fim com eletrólito por 10

min; entre as injeções, o capilar foi lavado com o uma mistura etanol/água 50% v/v por 1 minuto e eletrólito por 1 min; e ao final do dia de trabalho, lavado com a mistura etanol/água 50% v/v por 5 minutos, seguido por injeção de ar, para fim de secar o capilar. A injeção da amostra foi hidrodinâmica pelo *outlet*, a 0,5 psi e por 3 segundos.

3.2. Soluções

Os reagentes utilizados eram de todos de classe analítica, dodecil sulfato de sódio (SDS) obtido da Sigma-Aldrich (Japan), tetraborato de sódio (TBS) da Riedel-de-Haen (Germany), água foi deionizada e purificada em um sistema de purificação de água Millipore Milli-Q Gradient® (USA); álcool etílico absoluto (EtOH) e tetraidrofurano (THF) da Labsynth (Diadema, SP).

3.3. Eletrólito

O preparo era diário, a partir da mistura 1:1 de dois eletrólitos estoque:

- Eletrólito 1: 30 mmol L⁻¹ de SDS, 20 mmol L⁻¹ de TDS com 20% de etanol;
- Eletrolito 2: 30 mmol L⁻¹ de SDS, 20 mmol L⁻¹ de TDS com 1% de tetrahidrofurano.

3.4. Padrões

Os padrões de dipropionato de beclometasona, betametasona, furoato de mometasona, prednisona e 21-acetato de prednisolona (utilizado como padrão interno) foram todos obtidos da Sigma-Aldrich Corporation (USA).

O preparo da mistura de glicocorticoides para trabalho era diário, e partiram da diluição de soluções estoque preparadas em álcool etílico absoluto na concentração de 2000 mg.L⁻¹ e mantidas em temperatura ambiente. Para o trabalho as soluções foram diluídas em SDS 6 mmol.L⁻¹/TBS até a concentração de interesse (variando de 25 a 200 mg.L⁻¹).

3.5. Curva de calibração

Alíquotas de 12.5, 25.0, 50.0, 67.5, 85.0 e 100.0 μL , da solução padrão estoque de glicocorticoide ($2000 \mu\text{L.mL}^{-1}$) foram transferidas separadamente para o *vial* do equipamento, adicionado 50.0 μL do padrão interno ($2000 \mu\text{L.mL}^{-1}$) e diluído até volume total de 1 mL. Cada solução foi injetada em triplicada. A razão das áreas dos picos padrão e padrão interno foi disposta num gráfico *versus* a concentração do glicocorticoide de interesse.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Desenvolvimento do método

Os métodos propostos para os glicocorticoides se basearam no ponto E do triangulo de misturas, o qual é constituído de 30 mmol.L^{-1} de SDS e 20 mmol.L^{-1} TBS, e conta com 10% de etanol e 0,5% de tetrahydrofurano como aditivos. Este ponto foi o eleito por:

- a) Presença de uma quantidade considerável de etanol, que por se tratar de um solvente polar prótico ele atua como ácido doando estes prótons e por haver elétrons livres no oxigênio atua como base recebendo prótons, assim existem eficientes ligações de hidrogênio e provoca uma alteração no meio aquoso;
- b) Apresenta uma quantidade (mesmo que pequena) de tetrahydrofurano, e por se tratar de um solvente mais hidrofóbico, ele contribui na solvatação do anel esteroide dos compostos;
- c) Trata-se de uma mistura binária de solventes, facilitando o processo de obtenção do eletrólito final, apesar de situações com meio ternário haver uma melhor resolução entre picos quando analisados simultaneamente, se torna mais trabalhoso sua confecção, e visto que as formulações farmacêuticas não trazem diferentes glicocorticoides na sua composição, não há necessidade pensar em termos de resolução (ainda mais quando o padrão interno por possuir carga está em todas as situações migrando com uma velocidade bem superior aos demais glicocorticoides).

Ao se optar em injetar pelo *outlet* do equipamento tem-se uma redução do percurso a ser realizado pelos analitos até a janela de detecção, mudando de 40,2 cm para 10,2 cm, e com isso se reduz consideravelmente os tempos de análise. A fim de buscar os melhores tempos possíveis sem afetar muito a resolução entre os picos, a tensão de corrida para cada par analito/padrão interno foi o parâmetro que se modificou quando baseado no método inicialmente proposto no triângulo de misturas.

A tensão de corrida tomada como partida foi de 25 kV, a mesma do ponto E, mas com a mudança da polaridade, visto que a injeção é inversa, passando assim de polaridade positiva para negativa (+25 kV → -25 kV). A variação da tensão de corrida se deu regredindo em duas unidades de medida (-25 kV, -23 kV, -21 kV, -19 kV, -17 kV e -15 kV) e as melhores condições ao se considerar qualidade da linha de base e redução do tempo de análise são representados nas figuras 5.1., 5.2., 5.3. e 5.4.

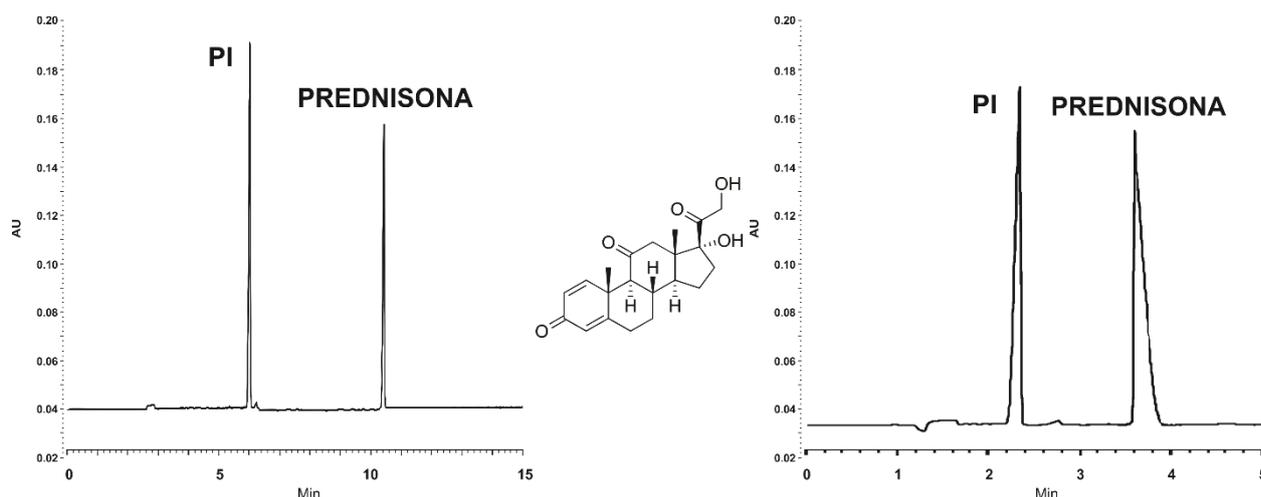


Figura 5.1. Prednisona: injeção inlet a +25kV e injeção outlet a -15kV. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF.

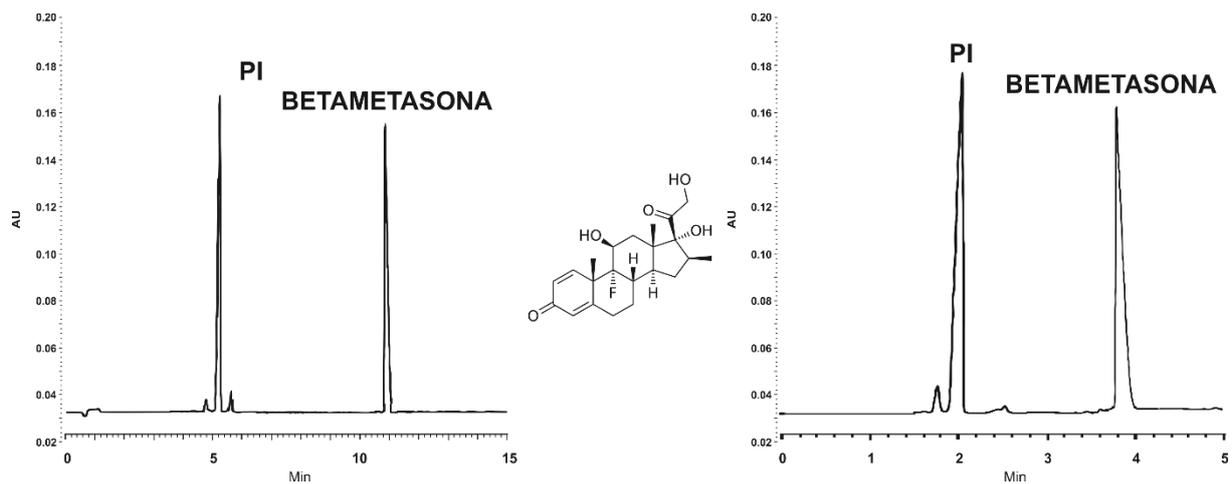


Figura 5.2. Betametasona: injeção inlet a +25kV e injeção outlet a -17kV. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF.

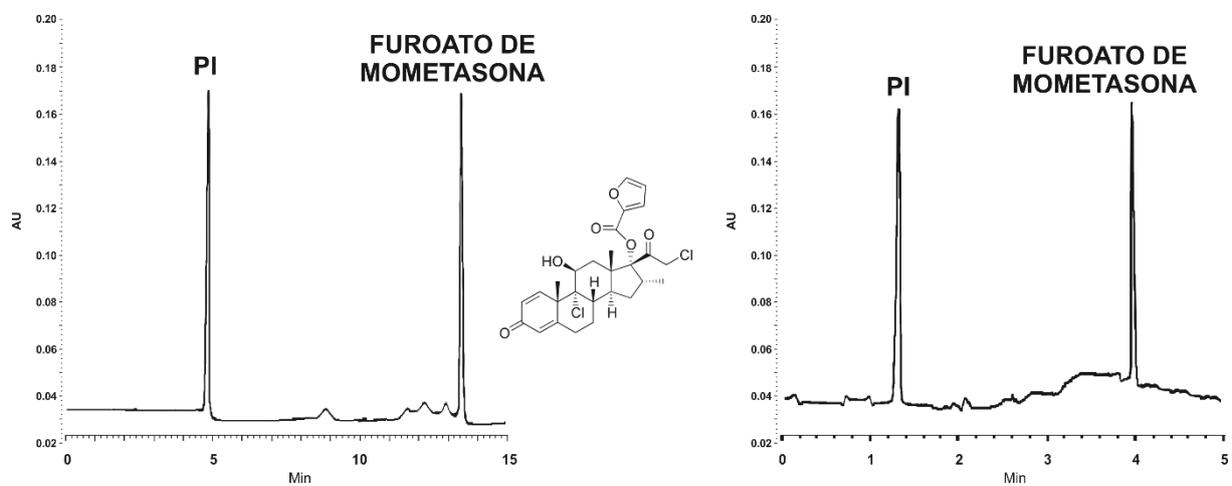


Figura 5.3. Mometasona: injeção inlet a +25kV e injeção outlet a -21kV. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF.

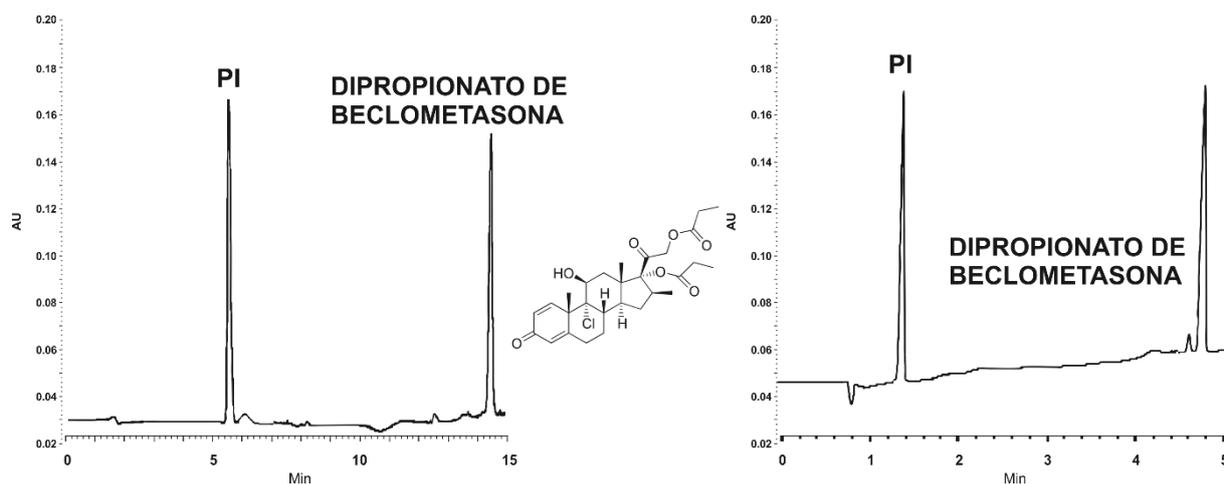


Figura 5.4. Beclometasona: injeção inlet a +25kV e injeção outlet a -21kV. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF.

Para os quatro glicocorticoides estudados, os tempos de análise reduziram consideravelmente:

- Prednisona: reduziu de 10,4 minutos para 3,8 minutos;
- Betametasona: reduziu de 11 minutos para 3,8 minutos;
- Furoato de mometasona: reduziu de 14,4 para 4,0 minutos;
- Dipropionato de beclometasona: reduziu de 14,8 para 4,2 minutos.

4.2. Validação do Método

Para que um método possa ser introduzido na rotina de análise, ele necessita ser validado, assim o mesmo gera informações confiáveis. Existem diferentes agências reguladoras, como ANVISA, USP, AOAC e INMETRO e cada qual possui diretrizes distintas.

As metodologias propostas para análise dos corticoides foram validadas de acordo com o protocolo preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166 de 24 de julho de 2017, nos parâmetros: seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação e robustez, precisão e exatidão [11].

4.2.1. *Seletividade*

A seletividade se trata da capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias de interesse na presença de componentes que possam vir a interferir, ou seja, trata-se de uma avaliação do grau de interferência de espécies, tais como, excipientes, impurezas, degradações ou até mesmo outro princípio ativo. Uma forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve migrar no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra ^[12].

Os métodos apresentaram no geral uma boa seletividade para os glicocorticoides propostos. Pois ao se utilizar o placebo (o qual tem todas as características de produção e composição, porém não tem o princípio ativo do medicamento) dos fármacos em estudo, se tem uma linha de base limpa nos tempos relativos aos analitos de interesse e assim não se identifica a presença de nenhum possível interferente no pico de interesse (Figura 5.5.).

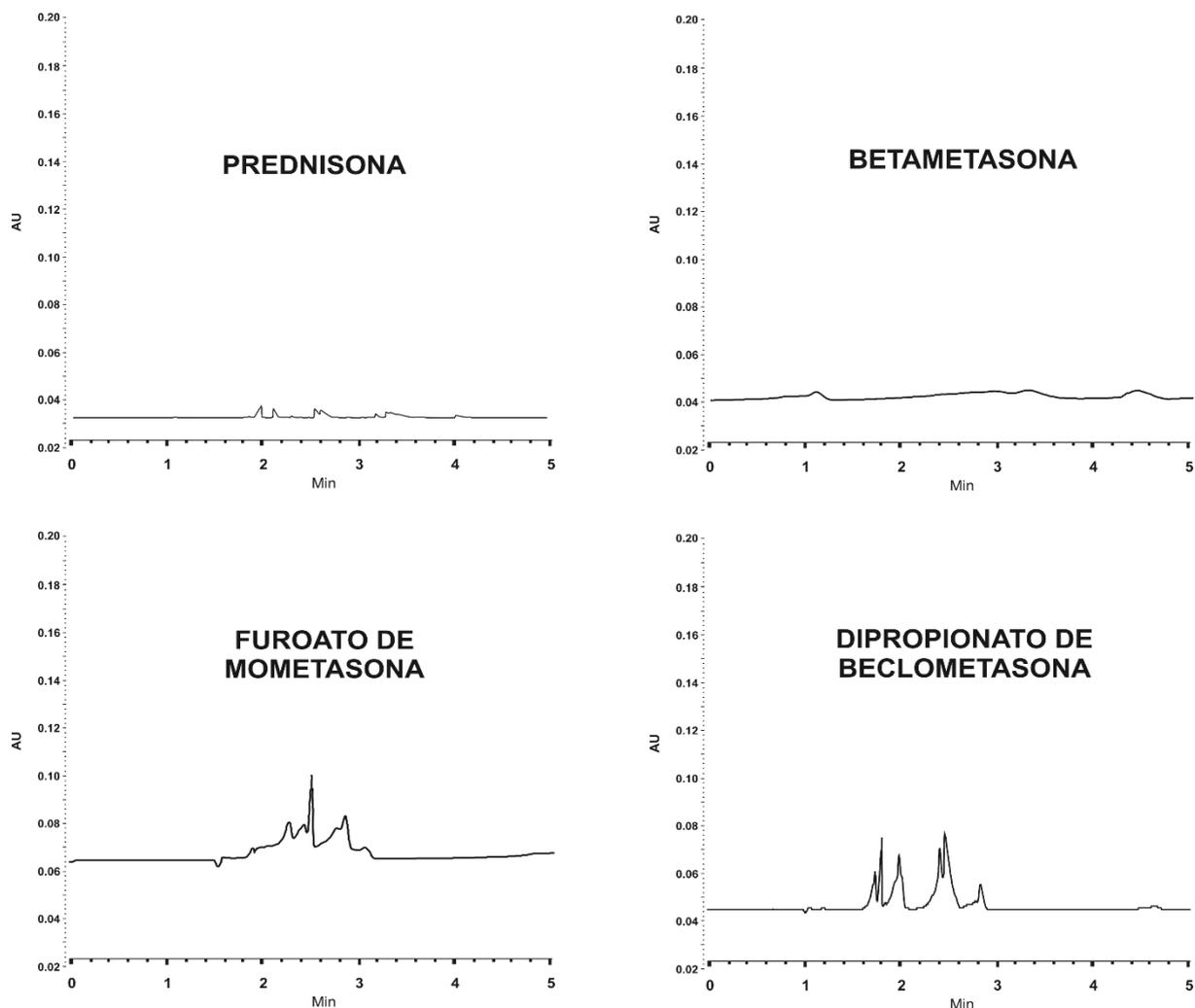


Figura 5.5. Linhas de base das amostras placebo para Prednisona, Betametasona, Furoato de Mometasona e Dipropionato de Beclometasona.

4.2.2. Linearidade

Para um método analítico, a linearidade é definida como sendo a capacidade da geração de resultados que reflita à concentração da amostra. Devido a este fato, a calibração é um dos mais importantes estágios na análise [12].

Buscando este parâmetro, uma relação linear é observada com base na resposta do detector (y), sendo intensidade ou área dos picos) e a concentração (x) do analito de interesse. Esta relação frequentemente é descrita por uma equação de regressão linear $y = ax + b$, onde o parâmetro a é o coeficiente angular da reta (correspondendo a inclinação da mesma) e b é a intersecção do gráfico de calibração. E esta regressão deve apresentar um alto coeficiente de correlação ($r^2 > 0,99$).

Construiu-se curvas analíticas para cada glicocorticoide, constituindo de 6 pontos e cada solução (25 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹, 135 mg.L⁻¹, 170 mg.L⁻¹ e 200 mg.L⁻¹) foi injetada com 6 repetições. As curvas são apresentadas abaixo (Figura 5.6 até 5.9), juntamente com seus parâmetros estatísticos, os quais mostram que os métodos possuem uma boa linearidade ($r^2 > 0,999$) entre a razão área (analito/padrão interno) e os glicocorticoides na faixa estudada.

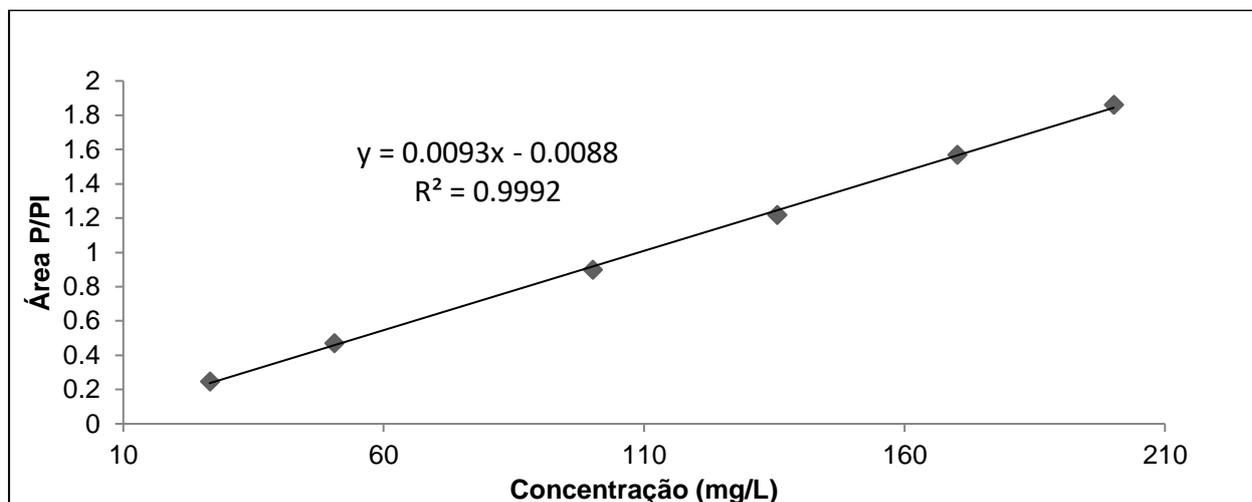


Figura 5.6. Curva analítica para prednisona. Faixa de concentração de 25 mgL⁻¹ a 200 mgL⁻¹. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF. Tensão -15 kV, injeção pelo outlet: 0,5 psi e detecção a 257nm.

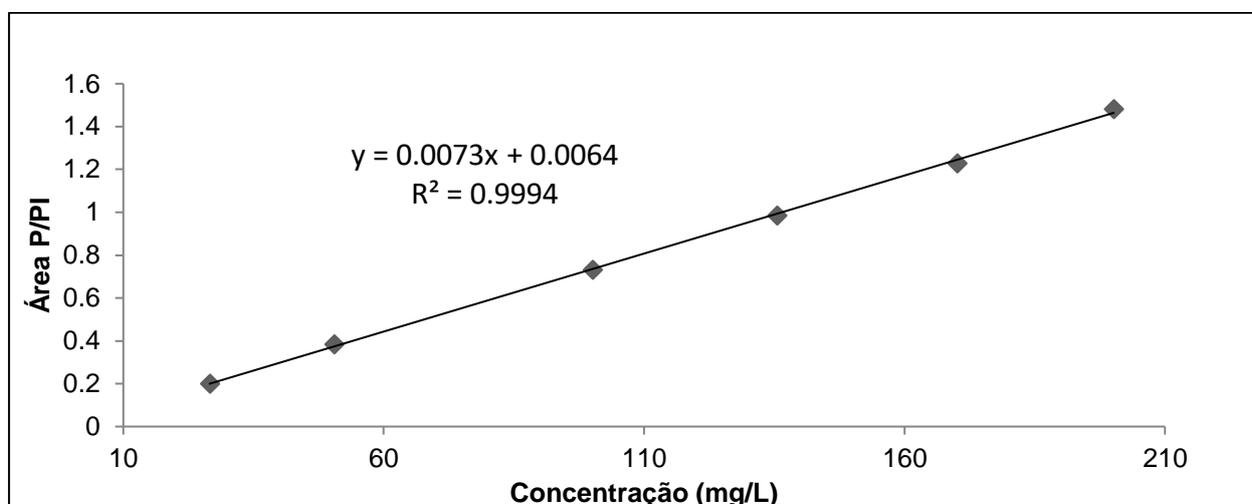


Figura 5.7. Curva analítica para betametasona. Faixa de concentração de 25 mgL⁻¹ a 200 mgL⁻¹. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF. Tensão -15 kV, injeção pelo outlet: 0,5 psi e detecção a 257nm.

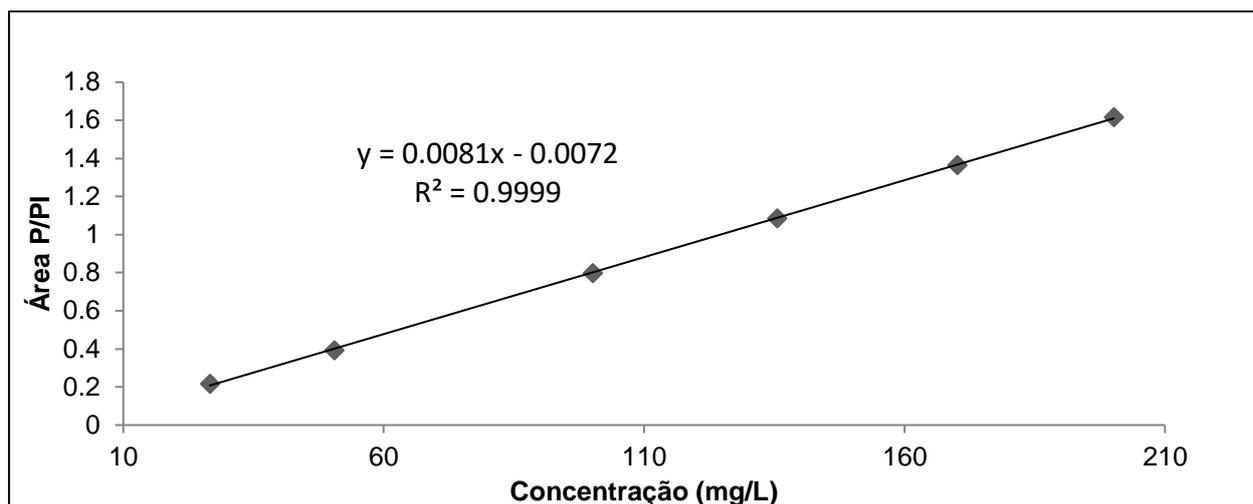


Figura 5.8. Curva analítica para mometasona. Faixa de concentração de 25 mgL⁻¹ a 200 mgL⁻¹. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF. Tensão -15 kV, injeção pelo outlet: 0,5 psi e detecção a 257nm.

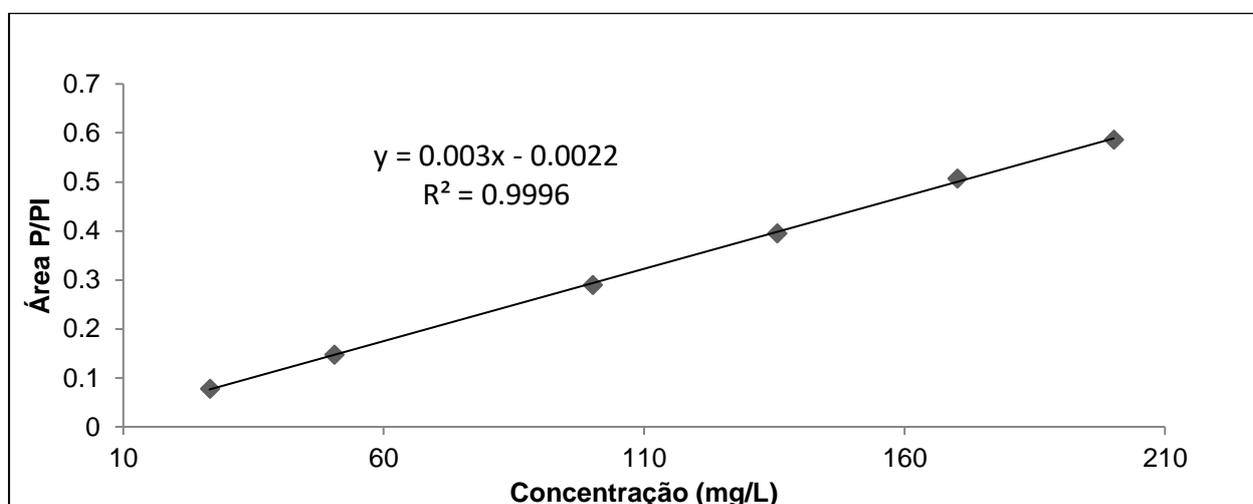


Figura 5.9. Curva analítica para beclometasona. Faixa de concentração de 25 mgL⁻¹ a 200 mgL⁻¹. Eletrólito: 30 mmol SDS, 20 mmol TBS e 10%EtOH + 0,5% THF. Tensão -15 kV, injeção pelo outlet: 0,5 psi e detecção a 257nm.

4.2.3. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) determina a concentração mínima da substância de interesse presente na amostra que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade através do procedimento experimental. O limite de quantificação (LQ) determina a concentração mínima da substância de interesse presente na amostra

que pode ser quantificada com um certo limite de confiabilidade através do procedimento experimental ^[12].

Para a determinação tanto do LD quanto do LQ se utilizam o coeficiente angular, *solpe* (S), de da reta, da curva analítica e do desvio padrão das respostas (SD), de acordo com as formulas ^[12]:

$$LD = \frac{3,3 SD}{S}$$

$$LQ = \frac{10 SD}{S}$$

Os valores de LD e LQ para os glicocorticoides em estudo estão apresentados na tabela 5.2.

Tabela 5.2. Limite de detecção e limite de quantificação para glicocorticoides

Glicocorticoide	Limite de Detecção (mg.L ⁻¹)	Limite de Quantificação (mg.L ⁻¹)
Prednisona	3,12	9,46
Betametasona	2,89	8,77
Mometasona	2,93	8,88
Beclometasona	2,60	7,88

4.2.4. Precisão

A fim de demonstrar a repetibilidade dos instrumental, dez injeções consecutivas da mistura padrão 100 µg.mL⁻¹ e 100 µg.mL⁻¹ do padrão interno foram realizadas para cada método proposto. Os valores de desvio padrão relativo (%RSD) foram inferiores a 0,80 % para a área relativa (razão padrão/padrão interno) e 0,40% para tempo de migração. Os dados são apresentados na tabela 5.3.

Tabela 5.3. Valores de desvio padrão relativo para a repetibilidade (n=10).

Glicocorticoide	RSD % área relativa	RSD % tempo de migração
Prednisona	0,77	0,31
Betametasona	0,68	0,35
Mometasona	0,49	0,39
Beclometasona	0,61	0,32

A precisão intra-ensaios (apresentada na tabela 5.4) foi avaliada empregando soluções de padrão e padrão interno e determinada em três níveis de concentração (80, 100 e 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), com três repetições cada por meio do desvio padrão relativo da área relativa (razão padrão/padrão interno). Por fim a média dos desvios padrões das de todas as análises foi calculado para determinar o desvio padrão relativo total das nove determinações.

Tabela 5.4. Valores de desvio padrão relativo para precisão intra-ensaio (n=3).

Glicocorticoide	Concentração da Amostra ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD % para área relativa	RSD % total
Prednisona	80	0,51	0,62
	100	0,76	
	120	0,60	
Betametasona	80	0,95	0,91
	100	0,88	
	120	0,91	
Mometasona	80	0,75	0,78
	100	0,94	
	120	0,66	
Beclometasona	80	0,50	0,87
	100	1,12	
	120	0,99	

Valores de RSD% abaixo de 2 são considerados aceitáveis (ANVISA – RDC 166), visto que para os quatro métodos propostos todos estão abaixo de 1%, consideram se os métodos propostos possuem uma boa precisão intra-ensaio.

4.2.5. Exatidão

Para a determinação da exatidão foi realizado o teste de recuperação: uma quantidade conhecida de padrão de interesse foi adicionada a amostras placebo baseadas em amostras comerciais (em 3 faixas de concentração) e analisadas em triplicata ^[12]. Segundo a ANVISA ^[11] a recuperação média deve ser de 100% ($\pm 5\%$) da concentração esperada. A tabela 5.5. mostra os valores obtidos.

Tabela 5.5. Método de validação referente à exatidão (teste de recuperação).

Glicocorticoide	Padrão adicionado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Padrão encontrado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
Placebo de prednisona	80	78,5	98,1
	100	98,8	98,8
	120	119,2	99,3
Placebo de Betametasona	80	79,2	99,0
	100	98,5	98,5
	120	118,7	98,9
Placebo de Mometasona	80	78,5	98,1
	100	98,3	98,3
	120	117,8	98,2
Placebo de Beclometasona	80	78,6	98,2
	100	98,7	98,7
	120	118,2	98,5

Cada valor mostra a média das três determinações de cada faixa.

A recuperação para dos glicocorticoides em placebo variou de 98,1 a 99,3% para, estando de acordo com o preconizado pela ANVISA^[11].

4.3. Análise

O método desenvolvido foi aplicado para quantificar os glicocorticoides a qual se destina em dois diferentes lotes de produtos comerciais para cada composto. Os resultados (Tabela 5.6.) se mostraram satisfatórios, visto que a determinação estava dentro dos limites de tolerância aceitáveis (90 – 110% de princípio ativo) e os desvios se mantiveram abaixo de 2%.

Tabela 5.6. Resultados das determinações de glicocorticoides em amostras comerciais.

Glicocorticoide	Lote	Concentração declarada (por unidade)	Concentração encontrada (por unidade)
Prednisona (comprimido)	1	20 mg	19,94 \pm 0,24 mg
	2	20 mg	19,84 \pm 0,28 mg
Betametasona (comprimido)	1	4 mg	4,02 \pm 0,11 mg
	2	4 mg	3,95 \pm 0,32 mg
Mometasona (cápsula)	1	200 μg	198 \pm 8,15 μg
	2	200 μg	201 \pm 10,9 μg
Beclometasona (cápsula)	1	200 μg	196 \pm 13,4 μg
	2	200 μg	208 \pm 5,50 μg

5. CONCLUSÃO

Os métodos mostram uma boa capacidade de resolver os picos padrão/padrão interno, um baixíssimo tempo de análise. Ao se optar pela injeção via *outlet*, e modificando a tensão aplicada, o tempo de análise de todos reduziu consideravelmente, sendo de cerca de um terço do tempo obtido para injeção via *inlet* e tensão a 25kV (4 minutos contra 12 minutos).

Os métodos propostos foram validados de acordo com suas características de desempenho apresentado seletividade, precisão, linearidade e exatidão. Os limites de detecção e limite de quantificação.

Devido a determinação com alta eficiência dos glicocorticoides (prednisona, betametasona, mometasona e beclometasona) pelo métodos e visto as características de desempenho satisfatórias, as metodologias podem vir a ser usados em análises de rona de medicamentos em laboratórios de controle de qualidade.

6. REFERÊNCIAS

- [1] GALOFRÉ J.C., Manejo de los corticoides en la práctica clínica. *Rev Med Univ Navarra*, 53 (1), 2009; 9-18
- [2] OLIVEIRA, J.C.A., Corticóides Inalatórios. *Pneumoatual*. Disponível em: <http://www2.unifesp.br/dmed/pneumo/Download/Corticoide%20inalatorio.pdf>. Acesso em junho de 2018
- [3] STANBURY R.M., GRAHAM E.M., Systemic corticosteroid therapy—side effects and their management. *Journal of Ophthalmology*, 82, 1998; 704–708
- [4] PERRETT D., Capillary electrophoresis in clinical chemistry. *Ann Clinical Biochemistry*, 36, 1999; 133-150
- [5] NISHI H., TERABE S., Micellar electrokinetic chromatography perspectives in drug analysis. *Journal of Chromatography A*, 735, 1996; 3-27
- [6] GÖRÖG S., Recent Advances in the Analysis of Steroid Hormones and Related Drugs. *Analytical Scientia*, 20, 2004; 767-782
- [7] ALTRIA K.D., McLEAN R., Development and optimisation of a generic micellar electrokinetic capillary chromatography method to support analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients. *Journal of Pharmaceutical Biomedicine*, 18, 1998; 807-813
- [8] TERABE S., OSTSUKA K., ANDO T., Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary. *Analytical Chemistry*, 57, 1985; 834-841
- [9] MA Y., LIU G., DU M., STAYTON I., Recent developments in the determination of urinary cancer biomarkers by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 25, 2004; 1473-1484
- [10] RAMAMOORTHY S., CIDLOWSKI J. A., Corticosteroid Mechanisms of Action. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 42 (1), 2016; 15-31
- [11] BRASIL. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em maio de 2018

[12] RIBANI M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS C.H., JARDIM I.C.S.F., MELO L.F.C., Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. Química Nova, 27 (5), 2004; 771-780

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Maicon de Moraes

Local e data de nascimento: São Leopoldo - RS, 02 de agosto de 1990

1. EDUCAÇÃO

Escola Técnica Estadual Frederico Guilherme Schimidt

São Leopoldo, Rio Grande do Sul

Ensino Médio 2007

Universidade Luterana do Brasil

Canoas, Rio Grande do Sul

Graduação (Licenciatura em Ciências: Habilitação Química) 2011

Universidade de São Paulo

São Paulo, São Paulo

Doutorado em Química (Química Analítica) Em andamento

2. PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Apresentação de Poster – LACE 2016 (Santiago, Chile)

Moraes, M., Farah, J.P.S., Tavares, M.F.M.

Optimization of an analytical method for glucocorticoids using micellar electrokinetic chromatography (MEKC)

Apresentação de Poster – LACE 2015 (Cartagena, Colombia)

Moraes, M., Farah, J.P.S., Tavares, M.F.M.

“Optimization of corticosteroids separation by micellar electrokinetic chromatography (MEKC)”

Moraes, M., Uezu, N., Picossi, C.R.C., Farah, J.P.S., Demtrio B.O., Freitas, F.A., Zilly, A., Tavares, M.F.M.

“Development of a micellar electrokinetic chromatographic method for the simultaneous determination of testosterone derivatives in seized formulations using multi-segment injection, solute identification via quantitative structure-retention relationships (QSRR) and single standard calibration procedures”

Demetrio, B.P., Oliveira, P.L.G., Moraes, M., Tavares, M.F.M., Zilly, A., Freitas, F.A.

“Determination of caffeine in ergogenic drugs seized on the border Brazil – Paraguay”

Apresentação de Poster – ITP & LACE 2014 (Natal, Brazil)

Morais, M., Tavares, M.F.M., Farah, J.P.S.

“Optimization of the separation of seventeen glucocorticoids by micellar electrokinetic chromatography”

Apresentação de Poster – LACE 2013 (Lima, Peru)

Morais, M., Sobral, L., Farah, J.P.S., Tavares, M.F.M.

“A drug release study from taioba starch using LSER/QSRR modeling”