

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Aplicações da eletroforese capilar na análise do biomarcador
alfa-1 glicoproteína ácida, no controle de qualidade do
biofármaco interferon alfa 2a e na avaliação da estabilidade
enantiosseletiva do fármaco isradipina**

Fernando Armani Aguiar

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Aplicações da eletroforese capilar na análise do biomarcador alfa-1 glicoproteína ácida, no controle de qualidade do biofármaco interferon alfa 2a e na avaliação da estabilidade enantiosseletiva do fármaco isradipina

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:
Medicamentos e Cosméticos.

Orientado: Fernando Armani Aguiar

Orientadora: Prof(a). Dr(a) Cristiane Masetto de Gaitani

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 08 de Agosto de 2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Aguiar, Fernando Armani

Aplicações da eletroforese capilar na análise do biomarcador alfa-1 glicoproteína ácida, no controle de qualidade do biofármaco interferon alfa 2a e na avaliação da estabilidade enantiosseletiva do fármaco isradipina. Ribeirão Preto, FCFRP – USP, Maio, 2013.

158 p.: il.; 30 cm

Tese apresentada ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP – USP para defesa do curso de Doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação, área de concentração de Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: de Gaitani, Cristiane Masetto.

1. Eletroforese capilar 2. Alfa1-AGP. 3. IFN alfa-2a. 4. Isradipina. 5. Controle de Qualidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Armani Aguiar

Aplicações da eletroforese capilar na análise do biomarcador alfa-1 glicoproteína ácida, no controle de qualidade do biofármaco interferon alfa 2a e na avaliação da estabilidade enantiosseletiva do fármaco isradipina.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Cristiane Masetto de Gaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Ademar e Elza,

*pelo amor, carinho, alegrias, ensinamentos e educação, que sempre servirão
como modelos de dedicação e trabalho.*

Aos meus irmãos, Rafael e Renato,

pelo amor, diálogos, discussões, alegrias e tudo mais....

À Gabriela,

pelo amor, carinho, diálogos, incentivos e companheirismo.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde, pelos momentos difíceis que nos ensinam e os alegres que nos revigoram.

Aos meus pais Ademar e Elza pela vida, carinho, incentivo e esforço para me proporcionar a melhor educação possível.

Aos meus irmãos Rafael e Renato, meus melhores amigos. Eu não teria conseguido estar onde estou se vocês não existissem.

À Gabriela pelo carinho e vida compartilhada nestes anos. Por incentivar e compartilhar todos os momentos da minha vida e principalmente desse projeto com dedicação e amor.

À Prof^a Dr^a Cristiane Masetto de Gaitani, minha orientadora, a quem devo a oportunidade de conclusão do meu Doutorado, por ter aceitado me orientar. Agradeço também por ser um exemplo de orientadora, sempre gentil e comprometida na formação de recursos humanos. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão.

À Prof^a Dr^a Glória Emília Petto de Souza, a Prof^a Dr^a Pierina Sueli Bonato e ao Prof^o. Dr Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira, pelo apoio e contribuição em minha formação científica.

À toda minha família por torcer e sempre acreditar em mim.

Aos amigos do laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP: Aline Ishikawa, Ana Débora, Greyce Kelly, Luíza Saldanha, Luciana Lourenço, Rodrigo Moreira, Jennifer Yokoya, Lanuze Toni, Luiz Fernando e Ivelise Gavarron pela amizade e apoio em todos os momentos e pelas discussões científicas.

Aos amigos dos laboratórios de Farmacologia da USP de Ribeirão Preto: Alexandre Kanashiro, David do Carmo Malvar, Débora Assis, Fabrício O. Souto, Sabrina Malvar, Miriam Cristina Contin Melo, Juliana Aparecida Vercesi, Marlene Rodrigues da Silva e Maria Aparecida Rose da Silva pelas alegrias, pela amizade, paciência e contribuição para o meu crescimento científico e humano.

*Aos **amigos** do laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar, Keyller Bastos, Leandro Calixto, Luciana Ângulo, Milena Tonon, Rodrigo Simões, Thiago Barth e Valquíria Jabor pelas discussões, convívio e amizade.*

*Aos **professores, funcionários e alunos** do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, pelo apoio constante e em especial às funcionárias da seção de pós-graduação: Aninha, Eleni e Rosana Florencio pela amizade.*

*A todos os **amigos das moradias da pós-graduação**, pela convivência, amizade e pelos momentos de alegria.*

*A **todos** que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.*

*A **Capes** pelo suporte financeiro.*

RESUMO

AGUIAR, F.A. **Aplicações da eletroforese capilar na análise do biomarcador alfa-1 glicoproteína ácida, no controle de qualidade do biofármaco interferon alfa 2a e na avaliação da estabilidade enantiosseletiva do fármaco isradipina.** 2013. 154f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A eletroforese é uma técnica de separação que se baseia na migração diferencial de compostos iônicos em tubo capilar semicondutor, preenchido com solução eletrolítica, sob a influência de campo elétrico. Na introdução desta tese, princípios, métodos e diferentes tipos de técnicas de eletromigração em capilar foram discutidos. No primeiro capítulo são mostrados os resultados de otimização e validação de um método eletroforético para a determinação das glicofomas da α 1-Glicoproteína Ácida, um biomarcador. A otimização das condições eletroforéticas usando eletrólito de corrida constituído por tricina (10 mmol L^{-1}), cloreto de sódio (10 mmol L^{-1}), acetato de sódio (10 mmol L^{-1}), ureia (7 mol L^{-1}) e putrescina ($3,9 \text{ mmol L}^{-1}$), pH de 4,5, tensão de 30 kV, e temperatura de análise de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ levou à resolução mínima de aproximadamente 1,5 entre as oito glicofomas encontradas. Todas as análises foram realizadas em um capilar de sílica fundida não revestido internamente, diâmetro interno de $50 \text{ }\mu\text{m}$ e comprimento efetivo de 50,0 centímetros. Após a otimização, o método foi validado, em que a linearidade foi obtida no intervalo de 0,125 a $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ($r \geq 0,993$). O coeficiente de variação (%) e erros relativos (%) obtidos nos estudos de precisão e exatidão, respectivamente, intra e inter-dias foram inferiores a 15 %. Após a validação o método foi aplicado para a análise da α 1-AGP em amostras de plasma de pacientes com sepse, o qual demonstrou uma variabilidade na concentração da glicofomas. No segundo capítulo, um método simples, rápido e econômico por eletroforese capilar, foi desenvolvido e validado para a determinação de Interferon alfa-2a, um biofármaco, em formulação farmacêutica. Após otimização, os melhores resultados foram obtidos utilizando solução tampão tetraborato de sódio 30 mmol L^{-1} , e pH 8,50, com 50 mmol L^{-1} de dodecil sulfato de sódio. A tensão aplicada foi de 25 kV e a injeção da amostra foi realizada no modo hidrodinâmico. Todas as análises foram realizadas em capilar de sílica fundida não revestido internamente, diâmetro interno de $75 \text{ }\mu\text{m}$ e comprimento efetivo de 50,0 centímetros. Sob estas condições, a análise foi realizada em menos de 10 min. A linearidade foi obtida no intervalo de 0,41-1,54 MUI mL^{-1} ($r \geq 0,997$). O coeficiente de variação (%) e erros relativos (%) obtidos nos estudos de precisão e exatidão, respectivamente, intra e inter-dias foram inferiores a 5 %. Após a validação o método foi aplicado no controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo o Interferon alfa-2a. No terceiro capítulo, um método enantiosseletivo simples por eletroforese capilar usando ciclodextrina como seletor quiral foi desenvolvido e validado para a determinação dos enantiômeros da isradipina, um bloqueador de canal de cálcio, em formulação farmacêutica. Além disso, foi realizado estudo de estabilidade dos enantiômeros da isradipina submetidos à oxidação, hidrólise (ácida e alcalina) e fotólise. A resolução completa dos enantiômeros da isradipina foi obtida em menos de 7 minutos utilizando solução tampão borato de sódio 15 mmol L^{-1} e pH 9,3 e sulfobutil éter- β -ciclodextrina (2,5 %, m/v) como seletor quiral. A tensão aplicada foi de 30 kV, e a injeção da amostra foi realizada no modo hidrodinâmico. Todas as análises foram efetuadas em capilar de sílica fundida não revestido internamente e diâmetro interno de $50 \text{ }\mu\text{m}$ e comprimento efetivo de 50 centímetros. A linearidade foi obtida no intervalo de 25 - $150 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos enantiômeros ($r \geq 0,998$). O coeficiente de variação (%) e erros relativos (%) obtidos nos estudos de precisão e

exatidão, respectivamente, intra e inter-dias foram inferiores a 5 %. Após o método ter sido validado, este foi aplicado na análise de formulações farmacêuticas contendo os enantiômeros da isradipina. Nos estudos de estabilidade foi observada degradação dos enantiômeros em todas as condições avaliadas. Assim, de acordo com os resultados obtidos após o desenvolvimento dos três métodos, pode ser concluído que a eletroforese capilar é uma poderosa técnica de separação com aplicações na investigação, desenvolvimento, controle de qualidade e estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos. Além disso, a eletroforese capilar é uma técnica complementar à cromatografia líquida de alta eficiência, que oferece vantagens como simplicidade, rapidez, baixo custo e consumo de solventes e reagentes e diferentes mecanismos de seletividade, podendo ser aplicada em diferentes tipos de amostras.

Palavras-chave: Eletroforese capilar, Alfa1-glicoprotéina ácida, Interferon alfa-2a, Isradipina, Controle de qualidade.

ABSTRACT

AGUIAR, F.A. **Applications of capillary electrophoresis in the analysis of biomarker alpha-1 acid glycoprotein, in the quality control of the biodrugs interferon alpha 2a, and enantioselective stability evaluation of drug isradipine.** 2013. 154f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Electrophoresis is a separation technique that is based on the differential migration of charged compounds in a semi-conductive medium under the influence of an electric field. In the introduction of this thesis, principles, methods, and different types of electromigrations techniques in capillary were discussed. In the first chapter shows the results of optimization and validation of a electrophoretic method for determining the glycoforms of α 1-AGP. The running buffer after optimization consisted of Tricine (10 mmol L^{-1}), sodium chloride (10 mmol L^{-1}), sodium acetate (10 mmol L^{-1}), urea (7 mol L^{-1}) and putrescine (3.9 mmol L^{-1}), pH 4.5, voltage (30 kV), temperature and analysis (35°C) led to resolution of at least of 1.5 among the eight glycoforms found. All analyses were carried out in a fused-silica uncoated capillary with an id of $50 \mu\text{m}$ and effective length of 50.0 cm. After optimization method was validated in which the linearity was obtained in the range to 0.125 to 2.5 mg mL^{-1} ($r \geq 0.993$). The coefficient of variation (%) and relative errors (%) obtained in the studies of precision and accuracy, respectively (intra-day and inter-day) were less than 15 %. After method validation, the analysis of α 1-AGP in plasma of septic patients was performed, which showed variability in the concentration of glycoforms. In the second chapter a simple CE based method was developed and validated for the determination of Interferon alpha-2a in a pharmaceutical formulation. After optimization, the best results were obtained using 30 mmol L^{-1} tetraborate buffer at pH 8.50 with 50 mmol L^{-1} of sodium dodecyl sulfate. The applied voltage was 25 kV, and the sample injection was performed in the hydrodynamic mode. All analyses were carried out in a fused-silica uncoated capillary with an id of $75 \mu\text{m}$ and effective length of 50.0 cm. Under these conditions, the analysis was achieved in less than 10 min. Linearity was obtained in the range 0.41-1.54 MIU mL^{-1} ($r \geq 0.997$). The RSD (%) and relative errors (%) obtained in precision and accuracy studies (intra-day and inter-day) were lower than 5 %. Therefore, this method was found to be appropriate for controlling pharmaceutical formulations containing Interferon alpha-2a. In the third chapter a simple enantioselective method based on CE using CD as chiral selector was developed and validated for the determination of isradipine (IRD) enantiomers in a pharmaceutical formulation and for the determination of IRD enantiomers in degradation studies. After optimization, the best results were obtained using 15 mmol L^{-1} borate buffer at pH 9.3 and sulfobutyl ether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD) (2.5 %, w/v) as chiral selector. The applied voltage was 30 kV, and the sample injection was performed in the hydrodynamic mode. All analyses were carried out in a fused-silica uncoated capillary with an internal diameter of $50 \mu\text{m}$ and effective length of 50 cm. Under these conditions, a complete separation between IRD enantiomers was achieved in less than 7 min. Linearity was obtained in the range 25 - $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ for both enantiomers ($r \geq 0.998$). The RSD (%) and relative errors (%) obtained in precision and accuracy studies (intra-day and inter-day) were lower than 5 %. Therefore, this method was found to be appropriate for controlling pharmaceutical formulations containing IRD enantiomers and the assay was considered stability indicating. The drug was subjected to oxidation, hydrolysis and photolysis. In all stress conditions the drug presented considerable degradation. According to such results, the capillary electrophoresis showed is a powerful separation technique to

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

