

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Ana Cláudia Bergamo

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL DE
METODOLOGIA POR ELETROFORESE CAPILAR PARA ANÁLISE DA
ASSOCIAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA**

Rio de Janeiro

2013

Ana Cláudia Bergamo

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL DE
METODOLOGIA POR ELETROFORESE CAPILAR PARA ANÁLISE DA
ASSOCIAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Área de Concentração em Qualidade de Produtos em Saúde, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ), como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira
Abrantes

Rio de Janeiro

2013

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Bergamo, Ana Cláudia

Desenvolvimento e validação interlaboratorial de metodologia por eletroforese capilar para análise da associação de sulfametoxazol e trimetoprima / Ana Cláudia Bergamo. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

81 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2013.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes

1. Eletroforese Capilar. 2. Combinação Trimetoprima-Sulfametoxazol. 3. Metodologia. I. Título.

Ana Cláudia Bergamo

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL DE
METODOLOGIA POR ELETROFORESE CAPILAR PARA ANÁLISE DA
ASSOCIAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Área de Concentração em Qualidade de Produtos em Saúde, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ), como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovada em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Roberta Amorin de Assis (Doutor)
Universidade Federal Fluminense

Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira (Doutor)
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade e força que me concedeu para que encontrasse o caminho e as pessoas a quem dedico este trabalho.

A minha família, que mesmo de longe sempre me apoiou muito e me deu oportunidade de estar aqui.

A minha orientadora Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes, que me acolheu como uma mãe, mesmo antes de me conhecer.

Ao meu namorado Leonardo Bettega pelo apoio, carinho e pela compreensão.

Aos meus queridos ex-colegas do Laboratório CTEFAR de Santa Maria, que contribuíram de alguma forma para que eu esteja aqui hoje.

Aos amigos do Laboratório de Alimentos e Contaminantes do INCQS, em especial a querida amiga Angela, por disponibilizar sempre vidraria impecável, para que possamos realizar nosso trabalho.

Só é lutador quem sabe lutar consigo mesmo.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

O Sulfametoxazol (SMX) é um antibiótico de amplo espectro, pertencente à classe das sulfonamidas. Ele inibe competitivamente a enzima bacteriana diidropteroato-sintetase, enquanto a trimetoprima (TMP) é uma inibidora da diidrofolato-redutase. Ambas as drogas bloqueiam o metabolismo do ácido fólico produzindo uma atividade sinérgica antibacteriana. A associação é utilizada no tratamento de infecções bacterianas urinárias, das vias aéreas e de infecções oportunistas em portadores do vírus da imunodeficiência humana causadas por *Pneumocystis jiroveci*. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia analítica para a avaliação da associação de SMX e TMP em comprimidos por eletroforese capilar de zona (CZE). Desenvolveu-se e validou-se o método utilizando capilar de sílica de 56 cm de comprimento efetivo e diâmetro de 75 µm, mantido à temperatura de 25 °C com detecção por arranjo de diodos no comprimento de onda de 221 nm. Utilizou-se como eletrólito de corrida uma solução contendo tampão fosfato 15 mM, pH 6,2 e a diferença de potencial aplicada foi de 25 kV. O tempo de introdução da amostra foi de 15 segundos utilizando-se pressão de 45 mbar. O tempo de corrida foi de 10 minutos, com tempo de migração de aproximadamente 4 minutos para a TMP e 8 minutos para o SMX. A metodologia foi validada avaliando-se os parâmetros de linearidade, seletividade (efeito matriz e degradação acelerada), precisão, exatidão (procedimento de recuperação) e robustez. A faixa linear estabelecida na alíquota de análise para a TMP foi de 17 – 47 µg/mL e para o SMX foi de 100 – 220 µg/mL. O estudo do efeito matriz demonstrou que, para comprimidos de SMX e TMP, o método não apresenta efeito matriz. A precisão foi estudada pela repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Os resultados da repetitividade apresentaram um valor HorRat de 0,510 para o SMX e 0,572 para a TMP, sendo o critério de aceitabilidade $\leq 2,0$. A precisão intermediária foi avaliada com base no coeficiente de variação em % (CV%), apresentando resultados de 4,95 % para o SMX e 5,03% para a TMP, sendo esses valores considerados satisfatórios, com base nos critérios de aceitação (inferiores a 8%). A reprodutibilidade apresentou valor de HorRat de 1,25 para a TMP sendo esse valor considerado satisfatório com base nos limites de aceitação (inferiores a 2). Para o SMX o valor de HorRat para reprodutibilidade foi de 0,52, inferior ao limite de

aceitação que é de 2,0. O método mostrou-se exato com valores de taxa de recuperação entre 96,7% e 97,6% para o SMX e entre 96,5% e 102,4 % para a TMP. A robustez foi avaliada através de pequenas e deliberadas modificações nos parâmetros do método, observando-se pequenas alterações nos tempos de migração. Assim sendo, o método proposto pode ser aplicado para a análise quantitativa de SMX e TMP em comprimidos podendo contribuir para aprimorar o controle de qualidade dos produtos farmacêuticos, reduzindo a utilização de solventes orgânicos e a geração de resíduos químicos e garantindo a segurança e eficácia terapêutica das formulações.

Palavras- chave: Sulfametoxazol. Trimetoprima. Eletroforese Capilar. Validação.

ABSTRACT

Sulfamethoxazole (SMX) is a broad-spectrum antimicrobial that belongs to a class of sulfonamide. It inhibits the bacterial enzyme dihydropteroate synthetase while trimethoprim (TMP) blocks the dihydrofolate reductase. Both drugs act synergistically and have a pronounced antibacterial activity, as they sequentially block two chemical reactions essential to bacterial survival. Clinically, the associated drugs are used to treat many kinds of infection caused by bacteria such as urinary infection, respiratory system infection and opportunistic infections in human immunodeficiency virus patients caused by *Pneumocystis jiroveci*. The aim of the present work was to develop and validate a capillary zone electrophoresis (CZE) method for the analysis of SMX and TMP in tablets. The CZE method was carried out on a silica capillary (56 cm effective length; 75 μ m internal diameter), maintained at 25 $^{\circ}$ C using photodiode array (PDA) detection at 221 nm. The running buffer consisted of 15 mM of phosphate buffer adjusted to pH 6.2 and the applied voltage was 25 kV. The time of sample introduction was 15 seconds using a pressure of 45 mbar. Under these conditions, the running time was 10 min with a migration time of 4 minutes for the TMP and 8 minutes for the SMX. The method was validated by evaluating the following parameters: linearity, selectivity (matrix effect and accelerated degradation), precision, recovery and robustness. The method was linear in the range of 100 - 220 μ g/mL for SMX and 17 - 47 μ g/mL for TMP, not presenting matrix effect. Precision was studied by repeatability, intermediate precision and reproducibility. Repeatability showed HorRat values of 0.510 for SMX and 0.572 for TMP, considering the acceptability criteria \leq 2.0. The intermediate precision was evaluated on the basis of CV %, presenting 4,95 % and 5.03% for SMX and TMP, respectively. These values were considered satisfactory based on the acceptance criteria (less than 8%). The reproducibility showed a HorRat value of 1.25 for TMP, which is a value considered suitable based on the acceptance criteria (below 2.0). For SMX, the reproducibility HorRat value was 0.52 and the limit of acceptance was 2.0. Recovery range was 96.7 % to 97.6 % for SMX and 96.5 % to 102.4 % for TMP. The robustness was assessed by small and deliberate changes in the method parameters, observing slight variations in migration times. The proposed method can be applied to the quantitative analysis of SMX and TMP in tablets and can contribute for the

improvement of the quality control of pharmaceutical products, reducing the use of organic solvents and waste generation, ensuring the safety and therapeutic efficacy of the formulations.

Key-words: Sulfamethoxazole. Trimethoprim. Capillary Electrophoresis. Validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do sulfametoxazol	15
Figura 2 - Estrutura química da trimetoprima.	16
Figura 3 - Estrutura química do ácido <i>para</i> - amino benzóico	16
Figura 4- Etapas do metabolismo do folato bloqueados pelas sulfonamidas e pela trimetoprima.	17
Figura 5 – Esquema de instrumentação utilizada na EC.....	23
Figura 6 – Eletroferograma da associação de trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX) (32 µg/mL de TMP e 160 µg/mL de SMX) utilizando capilar de sílica (75µm d.i; 56 cm), tampão fosfato 15mM, pH 6,2, 30kV, comprimento de onda 254nm.....	45
Figura 7 - Eletroferograma da associação de trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX) (64 µg/mL de TMP e 320 µg/mL de SMX) utilizando capilar de sílica (75µm d.i; 56 cm), tampão fosfato 15mM, pH 6,2, 30kV, comprimento de onda 254nm.....	45
Figura 8 - Eletroferograma da associação de trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX) (64 µg/mL de TMP e 320 µg/mL de SMX) utilizando capilar de sílica (50µm d.i; 56 cm), tampão fosfato 15mM, pH 6,2, 30kV, comprimento de onda 221nm.....	46
Figura 9 - Eletroferograma da associação de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) utilizando capilar de sílica fundida (56 cm; 75 µm d.i.), tampão fosfato 15 mM, pH 6,2 e detecção à 221 nm. O sinal analítico FEO representa o fluxo eletroosmótico.	49
Figura 10 - Curva analítica padrão do sulfametoxazol (SMX) em solução de metanol 50% (v:v)	50
Figura 11 - Curva analítica padrão da trimetoprima (TMP) em solução de metanol 50% (v:v)	51
Figura 12 - Eletroferograma da associação de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) submetidos a condições de hidrólise ácida com HCl 1N durante 1h.....	54
Figura 13 - Eletroferograma da associação de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) submetidos a condições de hidrólise básica com NaOH 1N durante 1h.....	54
Figura 14 - Eletroferograma da associação de sulfametoxazol e trimetoprima submetidos à agitação em vortex durante 1h.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos testes, segundo sua finalidade (ANVISA, 2003).....	28
Tabela 2 - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade (ANVISA, 2003)	28
Tabela 3 - Comparação da dispersão das diferentes formas de avaliação dos resultados para o sulfametoxazol e para a trimetoprima	48
Tabela 4 Resultados dos testes de premissas para a avaliação da linearidade e para a confecção da curva analítica padrão do sulfametoxazol ($\alpha=0,05$), empregando método de eletroforese capilar.	50
Tabela 5 - Resultados dos testes de premissas para a avaliação da linearidade e para a confecção da curva analítica padrão da trimetoprima ($\alpha=0,05$), empregando método de eletroforese capilar.	50
Tabela 6 - Testes de premissas para curva analítica em matriz do sulfametoxazol ($\alpha=0,05$), empregando método de eletroforese capilar	51
Tabela 7 - Testes de premissas para curva analítica em matriz da trimetoprima ($\alpha=0,05$), empregando método de eletroforese capilar	52
Tabela 8 - Resultados dos testes para a avaliação do efeito matriz do sulfametoxazol ($\alpha=0,05$), empregando método de eletroforese capilar	52
Tabela 9 - Resultados dos testes para a avaliação do efeito matriz da trimetoprima ($\alpha=0,05$), empregando método de eletroforese capilar	53
Tabela 10 - Resultados dos testes de degradação acelerada para o sulfametoxazol e para a trimetoprima	54
Tabela 11 - Avaliação da recuperação do método para o sulfametoxazol de acordo com os limites estabelecidos pela União Europeia.	55
Tabela 12 - Avaliação da recuperação do método para a trimetoprima de acordo com os limites estabelecidos pela União Europeia.	56
Tabela 13 – Resultados da análise de 9 repetições genuínas de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) para estudo da repetitividade do método.	56
Tabela 14- Resultados da análise em triplicada durante 5 dias da trimetoprima (TMP) para a avaliação da precisão intermediária.	57
Tabela 15 – Resultados da análise dos dados da precisão intermediária para a trimetoprima.	57

Tabela 16 - Resultados da análise em triplicada durante 5 dias do sulfametoxazol (SMX) para a avaliação da precisão intermediária.....	58
Tabela 17 - Resultados da análise dos dados da precisão intermediária para o sulfametoxazol.	58
Tabela 18 - Resultados do estudo colaborativo das análises da quantificação de trimetoprima (TMP) em comprimidos com a associação de SMX +TMP (400 mg+ 80mg) por eletroforese capilar modo CZE.	59
Tabela 19 – Médias, desvios padrões e coeficientes de variação de teores de trimetoprima (TMP) em comprimidos com a associação de SMX e TMP (400 mg + 80 mg) obtidos dos laboratórios participantes do estudo colaborativo.	59
Tabela 20 - Resultados do estudo colaborativo das análises da quantificação de SMX em comprimidos com a associação de SMX +TMP (400 mg+ 80mg) por eletroforese capilar modo CZE.....	60
Tabela 21 - Médias, desvios padrões e coeficientes de variação de teores de SMX em comprimidos com a associação de SMX e TMP (400 mg + 80 mg) obtidos dos laboratórios participantes do estudo colaborativo.	61
Tabela 22 - Resultados das variações dos parâmetros do método de eletroforese capilar modo CZE na avaliação da robustez para a determinação de trimetoprima .	62
Tabela 23 - Resultados das variações dos parâmetros do método de eletroforese capilar modo CZE na avaliação da robustez para a determinação de sulfametoxazol	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de massas sequencial
CLAE-UV	Cromatografia líquida com detecção por ultravioleta
CV%	Coefficiente de variação percentual
CZE	Eletroforese Capilar de Zona
DP	Desvio padrão
EC	Eletroforese capilar
FEO	Fluxo Eletroosmótico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PABA	ácido <i>para</i> – amino benzóico
pH	potencial hidrogênio
SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida
SMX	Sulfametoxazol
SUS	Sistema Único de Saúde
TMP	Trimetoprima
VIH	vírus da imunodeficiência humana adquirida
SQR	Substância Química de Referência

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 FARMACOLOGIA	15
1.2 INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS.....	18
1.3 VIGILÂNCIA SANITÁRIA NO CONTEXTO DO CONTROLE DE QUALIDADE DA ASSOCIAÇÃO DO SMX + TMP	19
1.4 ELETROFORESE CAPILAR	20
1.4.1 Definição	20
1.4.2 Fluxo eletrosmótico (FEO).....	21
1.4.3 Histórico	22
1.4.4 Instrumentação.....	22
1.4.5 Modos de separação	24
1.4.6 Aplicabilidade	25
1.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE SMX + TMP	26
1.6 VALIDAÇÃO	27
1.6.1 Linearidade.....	29
1.6.2 Seletividade.....	29
1.6.3 Precisão	30
1.6.4 Exatidão	31
1.6.5 Robustez	32
1.7 OBJETIVOS	32
1.7.1 Geral.....	32
1.7.2 Específicos.....	32
2 DESENVOLVIMENTO	33
2.1 MATERIAIS	33
2.2 EQUIPAMENTOS	33
2.3 AMOSTRAS E REAGENTES.....	34
2.4 ELETROFORESE CAPILAR.....	34
2.4.1 Procedimentos gerais.....	34
2.4.1.1 Preparo da solução tampão de fosfato de sódio monobásico.....	35

2.4.1.2 Preparo da solução de metanol 50% (v/v).....	35
2.4.1.3 Preparo das soluções padrão.....	35
2.4.1.4 Preparo da amostra.....	36
2.5 CONDIÇÕES ANALÍTICAS DE ELETRO-MIGRAÇÃO ESTUDADAS NO MODO CZE	37
2.5.1 Condições analíticas de eletro-migração otimizadas no modo CZE	37
2.6 VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL.....	38
2.6.1 Linearidade.....	38
2.6.2 Seletividade.....	39
2.6.2.1 Estudo do efeito matriz.....	40
2.6.2.2 Degradação acelerada	40
2.6.3 Exatidão – Procedimento de Recuperação	41
2.6.4 Precisão	42
2.6.4.1 Repetitividade.....	42
2.6.4.2 Precisão Intermediária.....	42
2.6.4.3 Reprodutibilidade	43
2.6.5 Robustez	43
2.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
2.7.1 Desenvolvimento do método.....	43
2.7.2 Validação do método.....	49
2.7.2.1 Linearidade.....	49
2.7.2.2 Seletividade.....	51
2.7.2.3 Exatidão – Procedimento de Recuperação	55
2.7.2.4 Precisão	56
2.7.2.5 Robustez	62
3 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO A – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA EM COMPRIMIDOS	70

1 INTRODUÇÃO

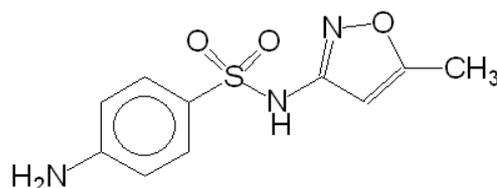
1.1 FARMACOLOGIA

As sulfonamidas foram os primeiros agentes quimioterápicos utilizados sistemicamente para a profilaxia e a cura de infecções nos seres humanos. Com o advento da penicilina e, posteriormente, de outros antibióticos ocorreu um decréscimo do uso das sulfonamidas. Todavia, a introdução da combinação de trimetoprima (TMP) com as sulfonamidas aumentou a utilização dessa classe terapêutica na profilaxia e no tratamento de infecções específicas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

As sulfonamidas são uma classe de antibacterianos derivados da *para*-amino-benzeno-sulfonamida. O grupo *para*-amino é essencial para a atividade do fármaco (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

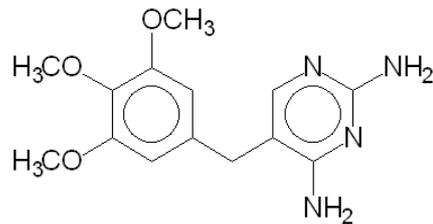
O sulfametoxazol (SMX) 4-Amino-*N*-(5-metil-3-isoxazolil) benzenosulfonamida, Figura 1, é uma sulfonamida da classe das sulfonamidas absorvidas e excretadas rapidamente. A trimetoprima (5-[(3,4,5-Trimetoxifenil)metil]-2,4-pirimidinadiazina) (O' NEIL et al., 1997), Figura 2 é um agente antifolato da classe das 2-4 diaminopirimidinas. Ambos são antibióticos de amplo espectro, ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Figura 1- Estrutura química do sulfametoxazol



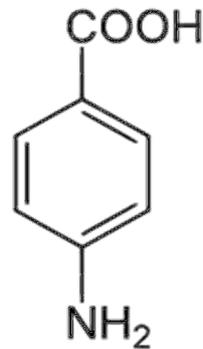
Fonte: BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012

Figura 2 - Estrutura química da trimetoprima.



Fonte: BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012

Figura 3 - Estrutura química do ácido *para*- amino benzóico



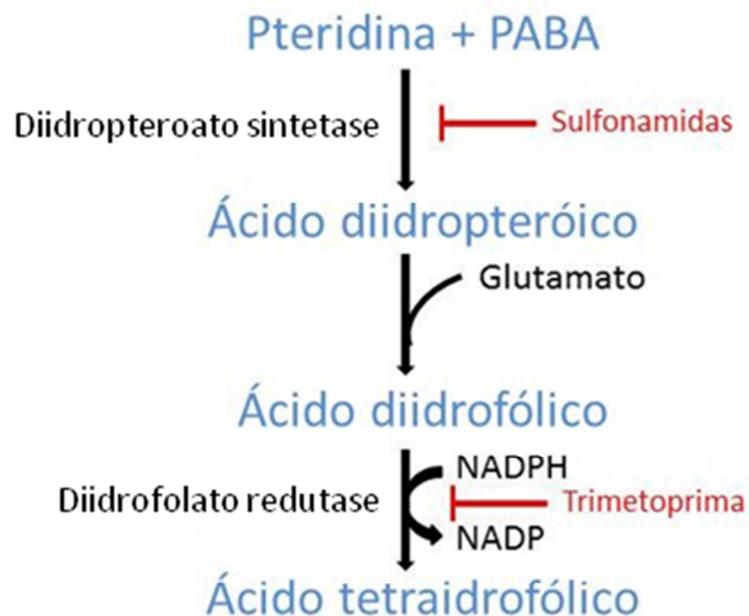
Fonte: O'NEIL, 1997

A administração de TMP e SMX tem efeito benéfico pela atuação dos fármacos em etapas diferentes do metabolismo bacteriano, cujo resultado é o aumento do espectro bacteriano e o aumento na atividade antimicrobiana, que passa de bacteriostática para bactericida. (BRASIL, 2010). A associação de SMX e TMP é conhecida como cotrimoxazol (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

As sulfonamidas apresentam uma estrutura química semelhante ao ácido *para*- aminobenzóico (PABA) (Figura 3), um precursor da síntese bacteriana do folato. O mecanismo de ação das sulfonamidas é baseado na inibição competitiva da diidropteroato-sintetase, atuando como substrato falso dessa enzima que é responsável pela incorporação do PABA à pteridina formando o ácido diidropteróico. Desse modo, impedem que as bactérias utilizem esse composto para sintetizar ácido fólico. As células de mamífero necessitam do ácido fólico pré-formado, já que não conseguem sintetizá-lo e, dessa forma, não são sensíveis a esses fármacos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

As diaminopirimidinas, classe à qual pertence a TMP, eram utilizadas antigamente para o tratamento da malária, porém atualmente não são mais recomendadas, pois os microorganismos encontram-se resistentes a essa classe. Posteriormente, observou-se que poderiam ser utilizadas para o tratamento de infecções causadas por outros microorganismos (BRASIL, 2010). A TMP produz um efeito sinérgico quando associado às sulfonamidas. Esse fármaco é um inibidor competitivo potente e seletivo da diidrofolato-redutase microbiana, a enzima que reduz o diidrofolato a tetraidrofolato. Conseqüentemente, a administração simultânea de sulfonamida e trimetoprima causa bloqueios sequenciais da via de síntese de tetraidrofolato dos microorganismos a partir de moléculas precursoras (BEDOR et al., 2008; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). O tetraidrofolato fornece grupos metila para a síntese de precursores do DNA (timidilato e purinas) e RNA (purinas) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). A Figura 4 apresenta as etapas bloqueadas pelo sulfametoxazol e trimetoprima no metabolismo do folato.

Figura 4- Etapas do metabolismo do folato bloqueados pelas sulfonamidas e pela trimetoprima.



Fonte: BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012

1.2 INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS

O SMX e a TMP apresentam perfil farmacocinético semelhante e isto foi o que permitiu a associação dos fármacos em dose fixa. O Formulário Terapêutico Nacional de 2010 cita a combinação dos fármacos como “a mais reconhecida associação entre agentes antimicrobianos”. Ainda segundo o Formulário Terapêutico Nacional de 2010, seu espectro de atividade antimicrobiana abrange grande número de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Haemophilus influenzae*, *H. ducrey*, *Salmonella typhimurium*, *Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Nocardia asteroides*, *Pneumocystis jirovecii*, *P. pseudomallei*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* (BRASIL, 2010).

A associação é indicada para quase todas as formas de infecções urinárias, não sendo recomendada do primeiro ao terceiro trimestre da gravidez. Tem uso indicado em shigeloses; diarreia infantil causada por *Escherichia coli*; profilaxia da diarreia dos viajantes e cólera. SMX + TMP possui indicação no tratamento da bronquite aguda, otite média, pneumonite e no tratamento de pneumonia pneumocística em pacientes imunodeprimidos (causada por *Pneumocystis jirovecii*, anteriormente denominado *P. carinii*) (BRASIL, 2010).

No Brasil, o SMX + TMP está disponível nas apresentações de comprimido 400 mg + 80 mg, suspensão oral (40 mg + 8 mg)/mL e solução injetável (80 mg + 16 mg)/mL (BRASIL, 2012).

Carlos Chagas descobriu o *Pneumocystis carinii* em 1909 porém, por engano, o caracterizou como um protozoário. Mais tarde, técnicas moleculares mostraram se tratar de um fungo que, atualmente, é denominado *Pneumocystis jirovecii*. Contudo, optou-se por manter a já consagrada sigla PCP – *Pneumocystis carinii* pneumonia. Este fungo é o agente causal de pneumonia pneumocística, a mais comum infecção oportunista que acomete indivíduos imunocomprometidos. SMX + TMP é sempre a primeira escolha de tratamento ou de profilaxia nesses indivíduos (BRASIL, 2010; HONG et al.; 1995).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou em 2006 um guia de orientações técnicas para que os países adotem o uso da associação de SMX e

TMP como profilaxia em crianças, adolescentes e adultos portadores do vírus da imunodeficiência humana adquirida (VIH) e em crianças expostas ao VIH, no contexto da melhoria dos cuidados em países em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos, a profilaxia com essa associação entre as crianças (tanto as expostas ao VIH quanto as portadoras) e em adultos e adolescentes portadores, vem sendo usada há muitos anos. A OMS alega que esta é uma intervenção para salvar vidas, simples e de baixo custo (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2006).

No âmbito nacional, o Programa Nacional de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), do Ministério da Saúde, tem entre seus principais objetivos, melhorar a vigilância, prevenção e controle de doenças sexualmente transmissíveis para portadores de VIH e grupos de risco. (WORLD BANK, 2003).

Os medicamentos para as infecções oportunistas fazem parte da lista dos medicamentos fornecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Há um interesse muito grande, por parte do Ministério da Saúde, em estimular e incentivar a produção de medicamentos a baixo custo pela rede oficial de laboratórios farmacêuticos, revertendo o quadro perverso da desassistência farmacêutica (BRASIL, 2009).

O Instituto de Tecnologia em Fármacos Farmanguinhos é um laboratório oficial brasileiro que está inserido neste contexto de produzir medicamentos a baixo custo e com qualidade, para aumentar o acesso da população àqueles que são considerados essenciais. O Instituto produz medicamentos que são fornecidos pelo gratuitamente pelo SUS. Farmanguinhos desempenha também um importante papel no fortalecimento das indústrias farmoquímicas nacionais e na regulação de preços do mercado farmacêutico brasileiro (FARMANGUINHOS, 2009).

1.3 VIGILÂNCIA SANITÁRIA NO CONTEXTO DO CONTROLE DE QUALIDADE DA ASSOCIAÇÃO DO SMX + TMP

No Brasil, as técnicas para a análise desta associação são estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira. Em geral, são descritas técnicas por CLAE, as quais apresentam algumas desvantagens, como o alto custo por utilizarem grande

quantidade de solventes orgânicos, causando impacto negativo na saúde do trabalhador e no meio ambiente (FARMACOPEIA, 2010; THE UNITED, 2012).

Tendo em vista que o preço de um medicamento é composto não só pelo custo da sua produção, como também das análises as quais esse medicamento é submetido para o controle de qualidade, métodos analíticos de baixo custo adquirem grande importância.

A Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, que dispõe sobre a criação da Vigilância Sanitária, define entre as competências da mesma, “a colaboração na proteção do meio ambiente, nele compreendido, o do trabalho”. (BRASIL, 1990) Levando em consideração que métodos analíticos por eletroforese capilar (EC) utilizam pouco ou não utilizam solventes orgânicos, a substituição dos métodos cromatográficos na indústria farmacêutica por métodos de eletroforese capilar, pode possuir grande relevância no contexto da Vigilância Sanitária, pois contribui para a redução dos resíduos químicos gerados e, também, pela menor exposição do trabalhador a solventes orgânicos que, em sua maioria, apresentam grande toxicidade.

Estando a Vigilância Sanitária incluída no campo de ações do SUS, o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a análise da associação de SMX e TMP por EC, que possa vir a substituir no futuro os métodos cromatográficos utilizados atualmente, representa uma estratégia para diminuir o custo do medicamento, reduzir a utilização de solventes orgânicos e, também, a geração de resíduos.

1.4 ELETROFORESE CAPILAR

1.4.1 Definição

A EC é uma técnica de instrumentação analítica utilizada para detecção, separação e/ou quantificação de moléculas e íons de origem química ou biológica. É definida como o transporte, em solução eletrolítica, de substâncias carregadas eletricamente sob a influência de um campo elétrico, no qual a separação entre dois

solutos ocorre de acordo com as diferenças entre suas mobilidades eletroforéticas. A velocidade do analito pode ser calculada de acordo com a seguinte equação (LANDERS, 1996):

$$V_i = \mu_e \cdot E$$

Sendo que,

V_i = velocidade do analito

E = campo elétrico

μ_e = mobilidade eletroforética

1.4.2 Fluxo eletroosmótico (FEO)

Um componente fundamental da operação de EC é o fluxo eletroosmótico (FEO). O FEO é o fluxo de massa de líquido no tubo capilar e é uma consequência da carga da superfície na parede interna dos capilares. O FEO resulta do efeito do campo elétrico aplicado sobre a solução de dupla camada na parede. Em capilares de sílica fundida, o fluxo eletroosmótico é formado a partir da ionização dos grupos silanóis presentes na parede do capilar. Quando uma solução alcalina passa através do capilar, este adquire uma carga negativa. A seguir uma camada de contra íons é formada a fim de manter a eletroneutralidade, o que origina uma dupla camada elétrica composta por uma camada fixa e outra móvel. Quando se aplica um campo elétrico, forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa. Com isto, os íons arrastam moléculas de água pelo efeito da solvatação, formando um fluxo que é direcionado para o catodo, enquanto a parede do capilar permanece negativa. Neste caso, os cátions e o FEO migram em direção ao catodo, sendo que os cátions migram mais rapidamente, pois sofrem atração em direção a este polo. Espécies neutras são carregadas na mesma velocidade do fluxo eletroosmótico e não sofrem separação. Ânions migram mais lentamente, pois são atraídos pelo anodo, porém ainda assim, são carregados pelo FEO em direção ao catodo (HEIGER, 1997).

1.4.3 Histórico

A eletroforese como uma técnica de separação foi introduzida por Tiselius em 1937. Colocando em um tubo misturas de proteínas entre soluções eletrolíticas e aplicando um campo elétrico, o pesquisador percebeu que os componentes da amostra migravam em uma direção e com uma taxa determinada pela sua carga e mobilidade. Por esse trabalho de separação, Tiselius recebeu o Prêmio Nobel (HEIGER, 1997).

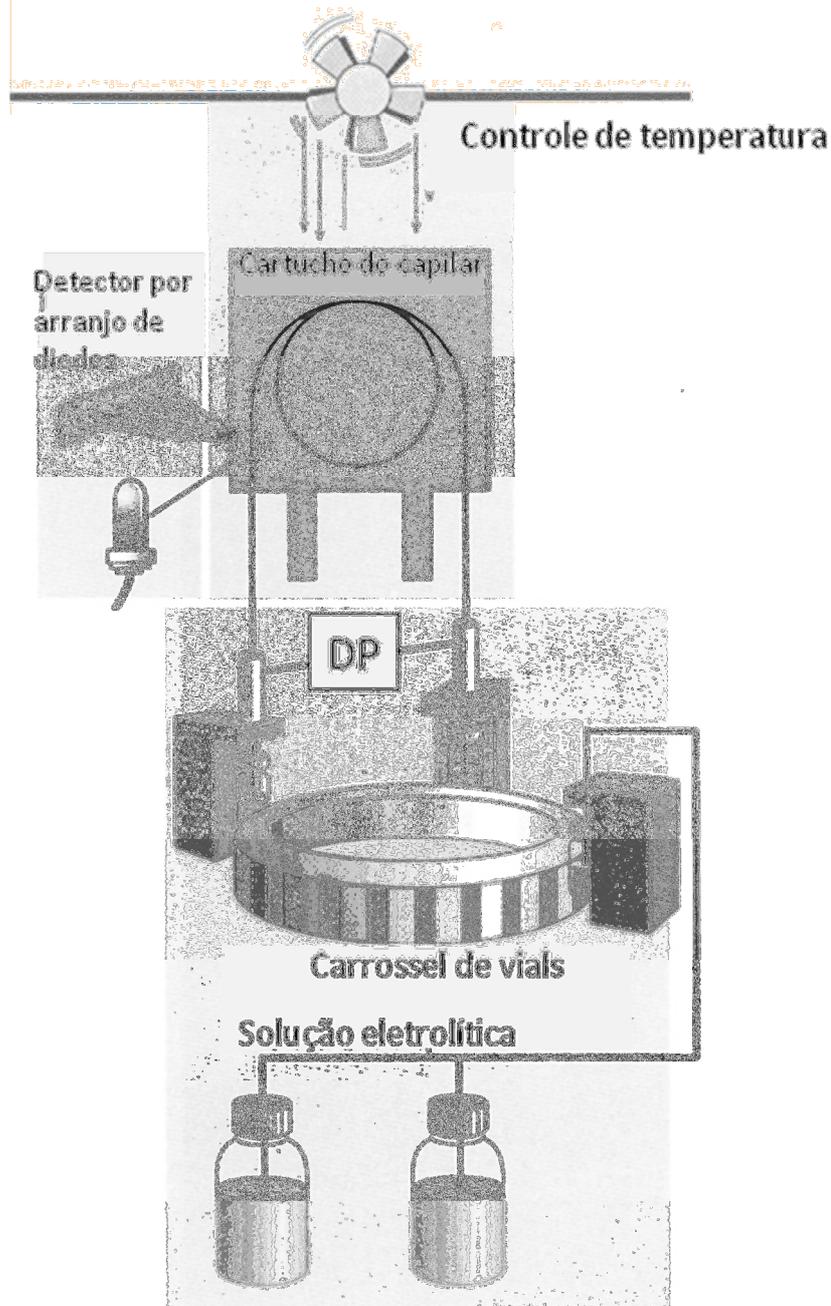
O final da década de 1980 e início dos anos 1990 viram o advento comercial da instrumentação da EC e a transformação de uma técnica de pesquisa em uma tecnologia de rotina em muitos ambientes industriais (HEIGER, 1997).

A análise de pequenas moléculas, como fármacos e agroquímicos, não foi historicamente estabelecida por EC, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a técnica mais utilizada nestas áreas. A EC foi, gradualmente, se estabelecendo como uma técnica alternativa e uma técnica de apoio para a CLAE.

1.4.4 Instrumentação

A instrumentação utilizada consiste no emprego de uma solução eletrolítica na qual são imersos eletrodos de platina. Através de uma fonte de alta tensão aplica-se uma diferença de potencial na solução eletrolítica onde também estão imersos as extremidades do capilar. O campo elétrico gerado é o responsável pela separação dos analitos que serão direcionados para um sistema de detecção. A amostra é introduzida no capilar através da aplicação de uma pressão. Esse é um dos modos mais utilizados para a introdução da amostra, porém, há outros como, por exemplo, a aplicação de uma diferença de potencial ou de vácuo. A Figura 5 apresenta o esquema da instrumentação utilizada (LANDERS, 1996).

Figura 5 – Esquema de instrumentação utilizada na EC.



Fonte: HEIGER, 1997.

Para otimizar a separação eletroforética, alguns fatores podem ser manipulados como o capilar, composição e concentração do tampão, temperatura, pH e diferença de potencial (HEIGER, 1997).

Segundo Heiger (1997) as soluções eletrolíticas devem apresentar as seguintes características:

- Constância no valor de pH (alta capacidade);
- Baixo valor de absorvância no comprimento de onda selecionado para a análise;
- Baixa mobilidade.

Existem diversos tipos de capilares, entre os quais se pode citar o de sílica fundida, que é o mais utilizado por possuir dimensões precisas, baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica e alta transmissão óptica para um intervalo do espectro de 190 a 900 nm. Há outros tipos de capilar com diversos revestimentos, como os revestidos com polímeros (HEIGER, 1997).

1.4.5 Modos de separação

Os modos mais utilizados de separação em eletroforese capilar são os seguintes:

- Eletroforese capilar em solução livre, conhecida pela sigla CZE, do inglês “capillary zone electrophoresis”: separa compostos carregados eletricamente. Consiste na aplicação de um campo elétrico a um tubo capilar que é preenchido com o eletrólito (solução tampão). É o modo mais simples e o mais utilizado (LANDERS, 1996).
- Cromatografia eletrocinética micelar, do inglês “micellar electrokinetic chromatography (MECK): separa tanto os compostos carregados eletricamente quanto os de carga neutra. Consiste na adição à solução eletrolítica de um surfactante, com concentração igual ou superior à concentração micelar crítica. Assim, propicia a partição diferenciada das espécies entre duas fases, através da formação de micelas que interagem com as moléculas não ionizáveis. As micelas são essencialmente esféricas, com as caudas hidrofóbicas das moléculas do surfactante orientadas em direção ao centro, para evitar a interação com o tampão hidrofílico, e a carga das “cabeças” orientadas para o tampão (HEIGER, 1997). O surfactante aniônico mais utilizado é o dodecil sulfato de sódio (SDS), pois apresenta baixa absorvância no UV e alta solubilidade (ALTRIA, 1999).

1.4.6 Aplicabilidade

A EC vem sendo utilizada com sucesso em muitas áreas de aplicação. As mais frequentes são as análises de produtos farmacêuticos, porém, há outras, como o controle de qualidade de imunobiológicos, as análises ambientais, o sequenciamento de DNA, a análise de proteínas e peptídeos e a separação de compostos quirais (HEIGER, 1997).

A análise de produtos farmacêuticos é predominantemente realizada utilizando a CLAE em diversas áreas de aplicação, incluindo análise de teor, a determinação de substâncias relacionadas, impurezas, as separações quirais, determinações em nível de traço e de quantificação de íons metálicos e ânions inorgânicos. Estas áreas de aplicação são igualmente possíveis pela EC. Portanto, EC é geralmente considerada como uma técnica complementar ou alternativa para a CLAE para a análise farmacêutica. Métodos de EC foram validados com êxito e foram incluídos nas submissões às autoridades regulatórias. A EC também está incluída em farmacopeias. Atualmente, mais de 50% dos instrumentos de EC mundiais estão localizados em empresas farmacêuticas (ALTRIA, 1999).

Em relação à CLAE, a EC tem uma série de vantagens a oferecer podendo-se citar: menor tempo de desenvolvimento do método, os custos operacionais reduzidos, o pequeno consumo de solventes orgânicos, além de uma maior eficiência na separação (maior número de pratos teóricos) e análise de solutos com poucos cromóforos no ultravioleta (ALTRIA, 1999).

Os fármacos, em sua grande maioria, são bases fracas e estão protonadas (carregadas positivamente) em baixos valores de pH. Portanto, uma solução eletrolítica com baixo valor de pH como o fosfato de sódio pode ser aplicado a uma grande quantidade de drogas básicas. Drogas ácidas podem ser resolvidas utilizando-se um pH próximo a 7 ou superior, utilizando um tampão borato ou fosfato. A separação de fármacos neutros requer a utilização do modo de separação por cromatografia eletrocinética micelar (HEIGER, 1997).

1.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE SMX + TMP

Os métodos oficiais recomendados pela Farmacopeia Americana (United States Pharmacopeia - USP), descrevem a utilização de técnicas espectroscópicas e cromatográficas, para identificação e quantificação dos fármacos, respectivamente (THE UNITED, 2012).

Na literatura encontram-se diversos trabalhos publicados utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e de eletroforese capilar para a identificação e o doseamento de SMX e TMP (AMINI et al., 2007; BEDOR et al., 2008; FAN et al., 2003; NEVADO et al., 2001; TESHIMA et al., 2004). Destaca-se o trabalho de Amini et al. (2007), que aperfeiçoaram a separação de SMX e TMP por CLAE, acoplada a espectrofotometria no ultravioleta (CLAE-UV), com a adição de trietilamina na fase móvel, o que produziu uma área maior para o pico de TMP e melhorou a eficiência da separação cromatográfica. Os autores destacam que o efeito benéfico de trietilamina foi, provavelmente, devido ao bloqueio de grupos silanóis livres na coluna de sílica, o que pode melhorar a cromatografia das drogas básicas como a TMP.

Bedor et al. (2008) desenvolveram e validaram um método de análise por CLAE acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) e, posteriormente, compararam com CLAE-UV. Concluíram que o método por CLAE-EM/EM apresentava menor tempo de análise e era cerca de seis vezes mais sensível do que CLAE-UV, representando, assim, uma ferramenta importante em estudos de bioequivalência, onde se processa um grande número de amostras.

Nevado et al. (2001) elaboraram um método de análise por CZE para a separação de sulfadiazina, SMX, TMP, bromexina e guaiacol. Utilizaram capilar de sílica fundida e tampão fosfato. O método apresentou boa resolução entre os sinais analíticos dos compostos, porém, os autores não validaram o procedimento e não demonstraram a aplicação desse método para formulações comerciais.

Teshima et al. (2004) desenvolveram um método por EC para a determinação de SMX e TMP em plasma humano. Os autores destacaram que o método foi aplicável para o monitoramento do nível sanguíneo da droga em pacientes

imunocomprometidos, que são tratados com essa formulação para a profilaxia de pneumonia por *Pneumocystis jiroveci*.

Fan et al. (2003), descreveram um método de separação por EC para sulfadiazina, SMX e TMP, que utiliza uma interface de introdução contínua da amostra, por eletroforese capilar microfluidica. Produziram uma interface com estrutura de canais de hidrogênio. Essa estrutura foi fixada numa base planar de plástico, utilizando um capilar horizontal de 5,6 cm de separação com duas pontas verticais em tubos que serviam como *inlet e outlet* para o fluxo eletrosmótico. A extremidade *inlet* também serviu para a separação e determinação de sulfadiazina, SMX e TMP, com detecção em 214 nm. A técnica, apesar de apresentar baixo custo e alta eficiência na separação, é de difícil aplicação, pois necessita de profissionais de alto nível técnico para a montagem da instrumentação e, além do mais, demanda tempo, sendo assim, dificilmente seria aplicada a uma rotina de controle de qualidade na indústria farmacêutica.

1.6 VALIDAÇÃO

O controle de qualidade de produtos farmacêuticos apresenta-se como um conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos, para que satisfaçam as normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade (ANVISA, 2003). Para garantir que os resultados do controle de qualidade sejam verdadeiros, é necessária a utilização de métodos oficiais ou validados. A validação é um dos meios universalmente reconhecidos como uma parte necessária para a garantia do sistema de qualidade na química analítica. Thompson e colaboradores destacam que métodos analíticos validados e, portanto confiáveis, são requeridos para a submissão à agências reguladoras nacionais e internacionais em todas as áreas de análise (THOMPSON et al., 2006).

O objetivo de uma validação no controle de qualidade de formulações farmacêuticas é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (ANVISA, 2003). Segundo o INMETRO (2011), a validação é necessária para:

- Métodos não normatizados;
- Métodos criados/desenvolvidos no próprio laboratório;
- Métodos normatizados usados fora dos escopos para os quais foram desenvolvidos;
- Ampliações e modificações de métodos normatizados. (INMETRO, 2011, p. 4)

Para o planejamento de uma validação é necessário definir os parâmetros e os critérios de aceitação dessa validação, de acordo com a finalidade pretendida.

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 29 de maio de 2003, define a categoria à qual o teste pertence de acordo com a finalidade, conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos testes, segundo sua finalidade (ANVISA, 2003)

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de <i>performance</i> (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Para cada categoria será exigido um conjunto de parâmetros, dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade (ANVISA, 2003)

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Faixa linear	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetitividade	Sim	Sim	Sim	Não
	Intermediária	**	**	**	Não
Limite de Detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

A finalidade do método proposto no presente trabalho é a identificação e o doseamento, portanto, enquadra-se na categoria I. Os parâmetros necessários são: seletividade, linearidade (faixa linear), precisão, exatidão e robustez.

1.6.1 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003; INMETRO 2011).

A RDC 899, de 23 de maio de 2003, recomenda que a faixa linear deva englobar o intervalo de 80% a 120% da concentração teórica do teste e que seja determinada através da análise de no mínimo cinco pontos de concentração (ANVISA, 2003).

O procedimento de linearidade descrito por Souza; Junqueira (2005) sugere que a avaliação da linearidade deve ser realizada através dos seguintes testes estatísticos:

- Normalidade dos resíduos – Teste de Ryan- Joiner
- Homogeneidade dos resíduos – Teste de Brown- Forstytthe
- Autocorrelação dos resíduos – Teste de Durbin- Watson

Caso o método satisfaça as premissas da avaliação da linearidade procede-se à análise de variância da regressão, através do método dos mínimos quadrados e falta de ajuste, por meio da análise de variância (ANOVA) (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

1.6.2 Seletividade

É a característica do método de garantir que não haja interferentes sendo identificados e/ou quantificados juntamente com o analito de interesse. Os experimentos para a avaliação da seletividade encontrados na literatura descrevem ensaios com o material de referência certificado, amostras com ou sem o analito e a

avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes, tais como, impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

Para a análise quantitativa, a seletividade pode ser avaliada através do estudo do efeito matriz. Souza; Junqueira (2005) descreveram o procedimento de efeito matriz da seguinte forma:

- Elaborar uma curva denominada de solventes, com o analito de interesse;
- Elaborar uma segunda curva com a presença da matriz da amostra que se pretende analisar, adicionando-se o analito de interesse.

Após a verificação do cumprimento das premissas da linearidade já descritas, procede-se a avaliação do efeito matriz, comparando as inclinações e interseções das curvas de solvente e de matriz através do teste *t* com variâncias combinadas (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Para a determinação de impurezas, quando esta ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, podem-se comparar os resultados do teste das amostras armazenadas sob condições de estresse como luz, calor, umidade, hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (ANVISA, 2003).

1.6.3 Precisão

A precisão de um método analítico expressa a proximidade das medições de uma mesma amostra através do grau de dispersão dos resultados. A precisão deve ser investigada entre uma série de replicatas genuínas obtidas de uma amostra homogênea sob um procedimento bem documentado. Esta é considerada em três níveis (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011):

a) Repetitividade (precisão intra-corrída): é a concordância entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo com as mesmas condições de operação, isto é, mesmo analista e mesma instrumentação.

A repetitividade do método é verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e

alta, com 3 replicatas cada ou, mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

b) Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, porém obtidos com uma variação dentro desse laboratório como, por exemplo, resultados obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (ICH, 2005).

c) Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para a inclusão de metodologia em farmacopeias (ICH, 2005).

A precisão é usualmente expressa como variância, desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de medições (ICH, 2005).

1.6.4 Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor que é aceito ou é padronizado como valor real ou valor de referência (ANVISA 2003; ICH 2005). Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis (INMETRO, 2011):

a) Procedimento de recuperação: realiza-se a análise de uma amostra, na qual uma quantidade conhecida do fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado);

b) Veracidade: nos casos em que as amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, utilizando um material de referência certificado.

A exatidão é calculada como percentual de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da seletividade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três replicatas cada (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

1.6.5 Robustez

É a medida da capacidade do método de apresentar precisão e exatidão após pequenas e deliberadas modificações nos seus parâmetros. A robustez fornece uma indicação da confiança do método durante as análises de rotina (ICH, 2005).

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Geral

Desenvolver e validar interlaboratorialmente uma metodologia analítica para a avaliação da associação de trimetoprima e sulfametoxazol em comprimidos por eletroforese capilar.

1.7.2 Específicos

Com base na literatura nacional e internacional, objetivou-se realizar os seguintes procedimentos:

- a) Desenvolver método físico-químico por eletroforese capilar para o doseamento de sulfametoxazol e trimetoprima em comprimidos;
- b) Validar a metodologia;
- c) Elaborar um procedimento operacional padrão;
- d) Identificar cinco laboratórios para a realização do estudo interlaboratorial;
- e) Realizar análise estatística dos resultados fornecidos;
- f) Publicar trabalho em revista científica.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAIS

- Pipeta automática de 100 µL calibrada;
- Pipeta automática de 1 mL calibrada;
- Balões volumétricos com capacidade para 50 mL, 100 mL e 500 mL calibrados;
- Provetas graduadas de 250 mL;
- Gral e pistilo;
- Capilar de sílica fundida Agilent Technologies de 64,5 cm de comprimento total (56 cm de comprimento efetivo) e 75 µm de diâmetro interno;
- Membrana filtrante de 0,22 µm.

2.2 EQUIPAMENTOS

Todos os equipamentos utilizados possuem procedimentos operacionais descritos e são qualificados periodicamente de forma a garantir as boas práticas de laboratório.

- Equipamento de EC Hewlett-Packard ^{3D}CE, com detector por arranjo de diodos (DAD), dotado de controle de temperatura por ar forçado, eletrodos de platina e “ChemStation Software”, modelo G1601A para o controle do equipamento e tratamento dos dados;
- Balança analítica, modelo CP225D, com cinco casas decimais, marca Sartorius;
- Sistema de purificação de água, modelo MILLI Academic, marca Millipore;
- Voltímetro acoplado a eletrodo de vidro, modelo 440, marca Corning;

- Banho ultrassônico, modelo 5510R-DTH, marca Branson;
- Agitador mecânico.

2.3 AMOSTRAS E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico e os solventes são de grau para CLAE.

- Substância química de referência do SMX (SQR). Lote: 1010. Teor: 99,7%, Farmacopeia Brasileira;
- Substância química de referência da TMP (SQR). Lote: 1011. Teor: 100%, Farmacopeia Brasileira;
- Comprimidos de SMX +TMP (400mg+80mg), Farmanguinhos;
- Matéria-prima de SMX (Farmanguinhos);
- Matéria-prima de TMP (Farmanguinhos);
- Metanol, grau para cromatografia líquida de alta eficiência, Merck;
- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4). Peso molecular: 119,98g/Mol, Merck;
- Solução de hidróxido de sódio 1 mM, Agilent;
- Solução de hidróxido de sódio 0,1 mM, Agilent;
- Água grau reagente tipo I (ultrapura), Millipore.

2.4 ELETROFORESE CAPILAR

Os experimentos de EC foram realizados no laboratório de Alimentos e Contaminantes, Departamento de Química, INCQS – FIOCRUZ - RJ.

2.4.1 Procedimentos gerais

2.4.1.1 Preparo da solução tampão de fosfato de sódio monobásico

Foi pesado 0,8999 g de fosfato de sódio monobásico e diluído com, aproximadamente, 450 mL de água em um balão volumétrico de 500 mL. A solução foi submetida ao ultrassom por 5 minutos e, posteriormente, ajustou-se o pH para 6,2 com solução de NaOH 1 N. O volume do balão foi aferido e filtrou-se a solução resultante com membrana filtrante de 0,22 μm .

2.4.1.2 Preparo da solução de metanol 50% (v/v)

Foram medidos em provetas 250 mL de água e 250 mL de metanol, sendo misturados em béquer.

2.4.1.3 Preparo das soluções padrão

a) Soluções padrão estoques de SMX

Pesou-se, em balança analítica calibrada, três massas de 50,00 mg do padrão de SMX e transferiram-se as mesmas, quantitativamente, com o auxílio de, aproximadamente, 10 mL da solução de metanol 50% (v:v) para balões volumétricos de 50 mL calibrados. As soluções foram agitadas e submetidas ao ultrassom por 5 min. Em seguida foram aferidos os balões volumétricos com a solução de metanol 50% (v:v) e homogeneizados. Após as correções de pesagem e consideração do volume real dos balões utilizados, a concentração final das soluções foi de 1000 $\mu\text{g/mL}$, aproximadamente.

b) Soluções padrão estoques de TMP

Pesou-se, em balança analítica calibrada, três massas de 50,00 mg do padrão de TMP e transferiram-se as mesmas, quantitativamente, com o auxílio de, aproximadamente, 10 mL da solução de metanol 50% (v:v) para balões volumétricos de 50 mL calibrados. As soluções foram agitadas e submetidas ao ultrassom por 5 min. Em seguida foram aferidos os balões volumétricos com a solução de metanol 50% (v:v) e homogeneizados. Após as correções de pesagem e consideração do volume real dos balões utilizados, a concentração final das soluções foi de 1000 µg/mL, aproximadamente.

2.4.1.4 Preparo da amostra

a) Amostragem

O peso médio dos comprimidos foi obtido a partir da pesagem de 20 unidades. Posteriormente, os comprimidos foram pulverizados com o auxílio de um gral e pistilo e homogeneizados por 10 minutos.

b) Procedimento da amostra

Pesou-se, em triplicata, uma massa equivalente a 100 mg de SMX do pó dos comprimidos pulverizados. Logo após, as massas foram transferidas para balões volumétricos com capacidade de 100 mL, com o auxílio da solução de metanol 50% (v:v). Em seguida, as soluções foram submetidas ao banho de ultrassom por 5 min.

Destas soluções foram tomadas alíquotas de 160 µL, introduzindo as mesmas em tubos tipo eppendorf de 1 mL. Adicionou-se aos tubos 780 µL da solução tampão de fosfato de sódio dibásico 15 mM, pH 6,2 (solução eletrolítica) e 60 µL da solução

de metanol 50% (v:v). Posteriormente, as alíquotas de análise foram filtradas com filtro 0,22 μm . A concentração final foi de 160 $\mu\text{g/mL}$ de SMX e 32 $\mu\text{g/mL}$ de TMP.

2.5 CONDIÇÕES ANALÍTICAS DE ELETRO-MIGRAÇÃO ESTUDADAS NO MODO CZE

- Capilar: foram testados os seguintes capilares:
 - a) Capilar de sílica fundida de 75 μm de diâmetro interno e 56 cm de comprimento efetivo (64,5 cm de comprimento total);
 - b) Capilar de sílica fundida de 50 μm de diâmetro interno e 56 cm de comprimento efetivo (64,5 cm de comprimento total).
- Diferença de potencial: foram testados os valores de 25 kV e 30 kV.
- Molaridade do tampão: as seguintes concentrações foram testadas: 15 mM e 10 mM de fosfato de sódio monobásico.
- Comprimento de onda (λ): foram avaliados os comprimentos de onda de 200 nm, 221 nm e 254 nm.
- Tempo de introdução da amostra: valores entre 4 segundos e 15 segundos foram avaliados.
- Pressão para introdução da amostra: foram testados os valores de 50 mbar e 45 mbar.
- Solução para diluir a amostra: foram testadas água ultrapura e solução eletrolítica.

2.5.1 Condições analíticas de eletro-migração otimizadas no modo CZE

- Capilar: capilar de sílica fundida de 75 μm de diâmetro interno e 56 cm de comprimento efetivo (64,5 cm de comprimento total)
- Diferença de potencial: 25 kV;
- Temperatura do cassete: 25° C;

- Eletrólitos: solução contendo 15 mM de fosfato de sódio monobásico no pH 6,2.
- Comprimento de onda (λ): monitorar em 221 nm;
- Modo de introdução das amostras: hidrodinâmica a 45 mbar durante 15s.
- Amostra diluída em tampão na concentração de 160 $\mu\text{g/mL}$ de SMX e 32 $\mu\text{g/mL}$ de TMP.
- Condicionamento inicial do dia: 30 min de NaOH 0,1 N; 10 min de água e 20 min de tampão.
- Condicionamento entre corridas: 1 min de NaOH 0,1 N; 2 min de água e 3 min de tampão.

2.6 VALIDAÇÃO INTERLABORATORIAL

O procedimento de validação foi baseado no trabalho publicado por Souza (2005). O método foi validado avaliando-se os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade (efeito matriz e degradação acelerada), precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade), exatidão (procedimento de recuperação) e robustez. Salienta-se que a precisão intermediária foi determinada segundo o INMETRO (2011) e o ICH (2005).

2.6.1 Linearidade

A linearidade foi testada através de ensaios com soluções padrão. Preparou-se, separadamente, uma curva analítica para o SMX e uma curva analítica para a TMP, com níveis de concentração igualmente espaçados. Para o SMX, os níveis de concentração foram os seguintes: 100, 120, 140, 160, 180, 200 e 220 $\mu\text{g/mL}$. Para a TMP, os níveis de concentração foram os seguintes: 17, 22, 27, 32, 37, 42 e 47 $\mu\text{g/mL}$. Para ambos os analitos, realizou-se três repetições independentes de cada

nível de concentração. Os procedimentos para o preparo das curvas padrões do SMX e da TMP encontram-se descritos no Anexo A.

Para a avaliação da linearidade, os resíduos de regressão de ambas as substâncias foram analisados. Os valores aberrantes foram tratados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, o qual foi aplicado consecutivamente até que novos valores aberrantes não fossem detectados, não ultrapassando, porém, o limite máximo de exclusão de valores, cujo percentual é de 22,2% do número de dados (BELSEY et al., 1980; HORWITZ 1995). Em seguida, analisaram-se as seguintes premissas: normalidade dos resíduos (pelo teste de Ryan-Joiner), homoscedasticidade (pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe) e não autocorrelação dos resíduos (teste de Durbin & Watson). Dessa forma, foi possível trabalhar com o método da regressão (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários-MMQO) e com falta de ajuste, através do teste F, o qual avaliou as significâncias da regressão e o desvio da linearidade avaliado contra o erro puro (BROWN; FORSYTHE, 1973; DRAPER; SMITH, 1998; DURBIN; WATSON, 1951; HORWITZ, 1995; LEVENE, 1960; RYAN; JOINER, 1972).

2.6.2 Seletividade

Um método indicador de estabilidade é definido como aquele capaz de quantificar os princípios ativos do medicamento sem sofrer influência de produtos de degradação, impurezas do processo, excipientes ou outras impurezas (ALSANTEA et al., 2007).

A capacidade do método foi determinada submetendo-se as soluções padrão de referência dos analitos a condições de degradação acelerada através de hidrólise ácida, básica, neutra (influência da temperatura), ação do UV, e ação da oxidação e da agitação. Deste modo avaliou-se a interferência dos produtos de degradação na quantificação dos analitos SMX e TMP.

A interferência dos excipientes da formulação farmacêutica foi determinada através do estudo do efeito matriz.

2.6.2.1 Estudo do efeito matriz

O procedimento descrito por Souza; Junqueira (2005) para a avaliação do efeito matriz propõe a utilização de duas curvas do analito: uma originada a partir de soluções do padrão, denominada solvente, e outra, originada da amostra, denominada matriz.

Foram preparadas curvas independentes para o SMX e para a TMP. A curva matriz foi preparada pelo método da adição, a partir dos excipientes do comprimido, respeitando-se a quantidade máxima permitida de cada excipiente. Alíquotas de solução de SMX e de TMP foram adicionadas às soluções com os componentes da matriz (excipientes) em níveis de concentração equivalentes a 100, 120, 140, 160, 180, 200 e 220 µg/mL, para o SMX e, a 17, 22, 27, 32, 37, 42 e 47 µg/mL para a TMP. Para cada concentração, foram realizadas três repetições independentes.

A curva com solvente foi preparada de modo idêntico ao preparo da curva para o estudo da linearidade.

Analisaram-se, pelo MMQO, os dados experimentais obtidos das curvas dos analitos em solvente e em matriz, sendo imprescindível o cumprimento das premissas citadas na avaliação da linearidade. Em seguida, procedeu-se a avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos, das curvas em solvente e na matriz e, através do teste de hipóteses, foram verificadas as suas equivalências. Pode-se assim, realizar a comparação entre as inclinações e interseções das curvas de solvente e de matriz através do teste *t* com variâncias combinadas. (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005)

2.6.2.2 Degradação acelerada

Amostras de soluções padrão submetidas às condições de degradação acelerada foram analisadas e comparadas a amostras de soluções padrão não submetidas a esses processos.

Para analisar a ação da hidrólise neutra sobre a estabilidade do SMX e da TMP, soluções padrão do SMX e da TMP foram submetidas à temperatura de 60 °C

durante 1h e, posteriormente, foram diluídas com solução eletrolítica e solução de metanol 50% para a concentração da alíquota de análise que é de 160 µg/mL para o SMX e 32 µg/mL para a TMP.

Para a análise da hidrólise ácida, foram adicionados ácido clorídrico (HCl) 1M à três alíquotas de análise de soluções padrão de SMX e TMP. Estas permaneceram sob influência do HCl durante 10, 30 e 60 min. Antes da análise, as alíquotas foram neutralizadas com hidróxido de sódio (NaOH) 1M.

O procedimento para a análise da hidrólise básica foi semelhante ao da hidrólise ácida, apenas invertendo-se a ordem em que o ácido HCl e a base NaOH foram adicionadas.

Para estudar a influência da agitação sobre a estabilidade do SMX e da TMP, soluções padrão de ambos analitos foram submetidas à agitação em vortex à temperatura ambiente durante 1h.

A ação da oxidação foi determinada através da exposição das soluções da substância química de referência do SMX e da TMP ao peróxido de hidrogênio 30% à temperatura ambiente durante 30 min.

As substâncias químicas de referência do SMX e da TMP foram irradiadas com UV durante 1h à temperatura ambiente, para realizar a análise da influencia da radiação sobre os analitos.

2.6.3 Exatidão – Procedimento de Recuperação

O procedimento de recuperação foi realizado separadamente para os analitos SMX e TMP. As amostras brancas foram fortificadas com soluções dos padrões analíticos do SMX e da TMP. O preparo das amostras dos brancos foi feito a partir dos excipientes do comprimido (matriz). Estas foram posteriormente fortificadas em três níveis de concentração: 80%, 100% e 120% em relação à alíquota de análise, que é de 160 µg/mL para o SMX e 32 µg/mL para a TMP. Em seguida, procedeu-se à extração dos analitos de modo idêntico ao procedimento de extração dos comprimidos.

A recuperação foi avaliada a partir da taxa de recuperação, sendo esta calculada a partir do quociente da concentração encontrada e da concentração teórica adicionada, multiplicada por 100.

2.6.4 Precisão

2.6.4.1 Repetitividade

A repetitividade foi avaliada por ensaios com comprimidos da associação de SMX e TMP. Procederam-se as análises em curto período de tempo e em condições equivalentes (mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo laboratório e mesmos reagentes). Primeiro, realizou-se o procedimento de extração dos analitos da matriz e, posteriormente, prepararam-se oito repetições genuínas na concentração da alíquota de análise de 160 µg/mL de SMX e 32 µg/mL de TMP. A repetitividade foi avaliada a partir da razão de HorRat, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{HorRat} = \frac{\text{CV}\%_r}{\frac{1}{2} \text{CV}\%_{\text{RHorwitz}}}$$

2.6.4.2 Precisão Intermediária

Os experimentos foram conduzidos em cinco dias, permitindo-se avaliar a precisão intermediária através do CV (%). O CV foi obtido a partir do desvio padrão da precisão intermediária e da média das mensurações dos cinco dias, sendo três ensaios por dia (INMETRO, 2011).

2.6.4.3 Reprodutibilidade

Foram selecionados cinco laboratórios para o estudo de reprodutibilidade. Foi enviado o POP, as SQR da Farmacopeia Brasileira e as amostras fornecidas por Farmanguinhos a todos os laboratórios. Foi dado um prazo para que os laboratórios participantes do estudo colaborativo enviassem os dados. As análises foram conduzidas em triplicatas genuínas.

A avaliação da reprodutibilidade foi realizada através da razão de HorRat.

$$\text{Razão de HorRat} = \frac{CV\%_{exp}}{CV\%_{Hor}}$$

2.6.5 Robustez

A robustez foi considerada na fase de desenvolvimento do método e, avaliada posteriormente, como um parâmetro da validação, certificando-se de que o método pode ser aplicado em outros laboratórios, com precisão e exatidão adequadas.

A robustez foi avaliada a partir de deliberadas variações nos parâmetros do método analítico. Realizaram-se variações nos seguintes parâmetros: comprimento de onda, diferença de potencial, tempo de introdução da amostra, molaridade do tampão, temperatura do cassete e pH do tampão. Procedeu-se à análise dos dados com a aplicação do teste *t* para amostras pareadas, sendo que, o teste tem como premissa a análise prévia das variâncias, as quais devem ser homogêneas.

2.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.7.1 Desenvolvimento do método

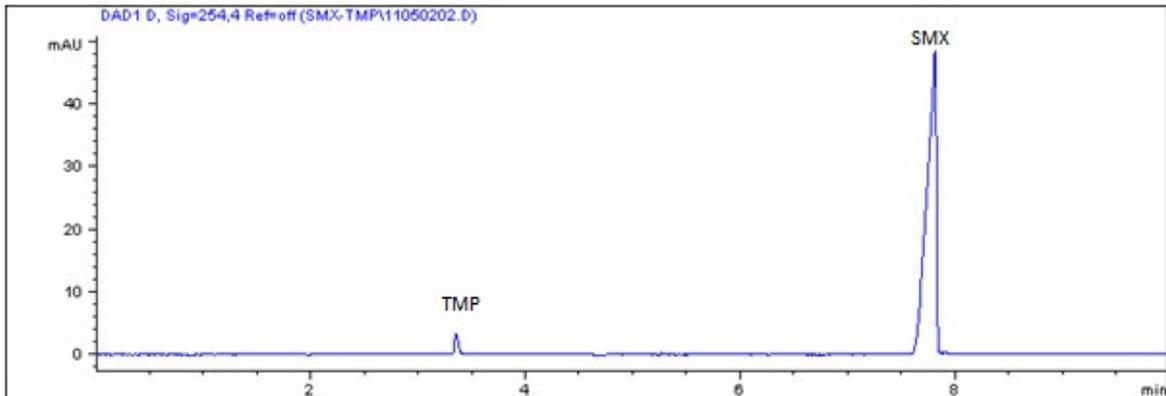
O método foi desenvolvido variando-se os parâmetros de capilar, concentração do tampão, pH do tampão, composição da solução extratora, temperatura do capilar, diferença de potencial, tempo de introdução da amostra, pressão empregada para introdução da amostra e comprimento de onda empregado para a detecção.

De acordo com Mayer (2001), um dos maiores problemas apresentados pela EC é sua baixa precisão. Na EC, a repetitividade geralmente não é tão adequada quanto na CLAE, sendo este um dos maiores obstáculos do uso da EC nas análises de rotina. Muitos parâmetros experimentais afetam a precisão do tempo de migração e da área do pico. A variância total do tempo de migração é devido a um conjunto de fatores, sendo eles: soma da variação do fluxo eletrosmótico, mobilidade do analito, interações com a parede do capilar e temperatura. A variância total da área do pico é devido a variação da injeção, difusão, temperatura, interações com a parede do capilar e integração da área do pico (MAYER, 2001).

As condições iniciais testadas foram baseadas no trabalho de Nevado e colaboradores (2001). Os parâmetros iniciais foram os seguintes: capilar de sílica de 56 cm de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno, tampão fosfato 15 mM, pH 6,2, temperatura de 25 °C tempo de introdução da amostra de 4s e pressão de 50 mbar, diferença de potencial de 30 kV e comprimento de onda de 254 nm. Esse autor utiliza como resposta a área do pico.

As condições otimizadas por esse autor eram adequadas para a separação dos analitos SMX e TMP somente se ambos estivessem em concentração semelhante na amostra e apresentavam variações significativas no perfil eletroforético entre uma introdução da amostra e outra, o que dificultaria uma quantificação. Como nas apresentações comerciais de comprimidos de SMX e TMP o primeiro fármaco apresenta-se em uma concentração cinco vezes maior que o segundo, a quantificação por tal procedimento seria inviável. Além do mais, observou-se que, para a análise de comprimidos da associação de SMX e TMP por essa técnica, a resposta para a TMP não era adequada para a quantificação, pois apresentava uma área de valor muito baixo, como demonstrado na Figura 6.

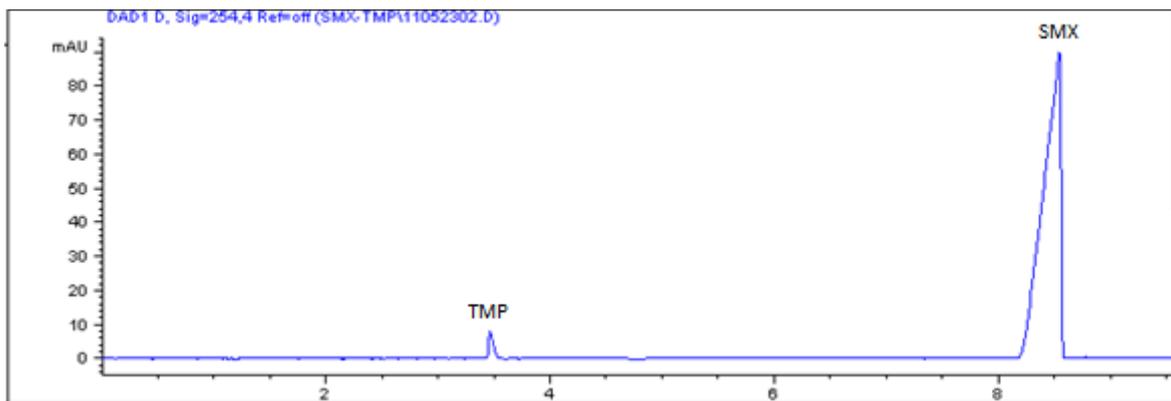
Figura 6 – Eletroferograma da associação de trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX) (32 µg/mL de TMP e 160 µg/mL de SMX) utilizando capilar de sílica (75µm d.i; 56 cm), tampão fosfato 15mM, pH 6,2, 30kV, comprimento de onda 254nm.



Fonte “Chemstation Software”.

Consequentemente, alterou-se a concentração dos analitos e percebeu-se que a resposta para a TMP continuava muito inferior à do SMX, como demonstrado na Figura 7.

Figura 7 - Eletroferograma da associação de trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX) (64 µg/mL de TMP e 320 µg/mL de SMX) utilizando capilar de sílica (75µm d.i; 56 cm), tampão fosfato 15mM, pH 6,2, 30kV, comprimento de onda 254nm.

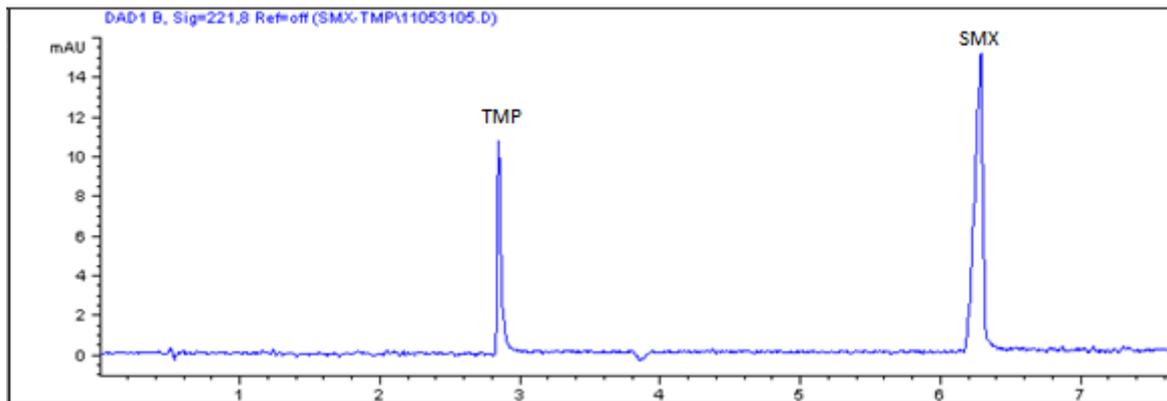


Fonte “Chemstation Software”.

Procedeu-se, então, à mudança da solução de diluição para os fármacos. Anteriormente, a solução era constituída de tampão e passou a ser diluída em água ultrapura, o que também não melhorou a resposta do analito TMP.

Em seguida, foi modificado o capilar para um de 56 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno e verificou-se, através da diminuição da altura dos analitos, que o método perdeu a sensibilidade como demonstrado na Figura 8.

Figura 8 - Eletroferograma da associação de trimetoprima (TMP) e sulfametoxazol (SMX) (64 $\mu\text{g/mL}$ de TMP e 320 $\mu\text{g/mL}$ de SMX) utilizando capilar de sílica (50 μm d.i; 56 cm), tampão fosfato 15mM, pH 6,2, 30kV, comprimento de onda 221nm.



Fonte "Chemstation Software".

Na sequência, foi alterado o comprimento de onda empregado. Foram testados três comprimentos de onda, 200 nm, 221 nm e 254nm. Monitorando-se em 200 nm a resposta é adequada para a quantificação, porém essa faixa apresenta sensibilidade muito maior para detectar ruídos na linha de base. O comprimento de onda de 254 nm apresenta-se próximo ao máximo de absorção para o SMX (que é de 280 nm), contudo, muito distante do máximo de absorção para a TMP (que é de 200 nm). O SMX exibe uma faixa mais larga de absorção no ultravioleta do que a TMP. Conseqüentemente, optou-se por monitorar em um comprimento de onda intermediário entre os máximos dos dois compostos, que foi em 221nm.

O condicionamento entre corridas também foi testado, verificando-se uma melhora aparente na altura dos picos sem hidróxido de sódio 1 N. Porém, quando foram submetidas a um maior número de corridas analíticas (9 no total), houve grande variação dessas áreas.

Foi testado também o aumento do tempo de introdução da amostra para 15s e observou-se que diminuiu a variação entre as áreas e conseguiu-se uma boa separação entre os picos (resolução). Conseqüentemente, resolveu-se manter o

tempo de injeção em 15s. Outro parâmetro modificado foi a pressão aplicada para a introdução da amostra, que foi diminuído de 50 mbar para 45 mbar, não alterando a resposta. Entretanto, essa pressão não utiliza o limite do equipamento, que é de 50 mbar, colaborando para a manutenção e para o bom funcionamento do mesmo.

Mayer (2001) destaca que utilizar pequenos volumes de injeção acarretam maiores erros. O controle preciso da pressão aplicada é difícil quando o tempo de injeção é muito pequeno e, ainda, a contribuição da injeção espontânea pode ser significativa. Outra limitação é que pode ocorrer difusão do analito para dentro ou para fora do capilar e esse processo é mais importante quando o tempo de injeção é curto.

Outro parâmetro em que foi optado por não se trabalhar nos limites do equipamento foi a diferença de potencial (o limite do equipamento é de 30 kV). Assim, modificou-se a diferença de potencial de 30 kV para 25 kV, não ocorrendo mudanças significativas no perfil eletroforético além do tempo de migração, que aumentou aproximadamente dois minutos para ambos analitos.

Para a quantificação, segundo Mayer (2001), podem-se utilizar a área ou a altura. Deve-se preferir trabalhar com a área do pico na maioria dos casos em EC. Porém em contraste com a CLAE, na EC as amostras não passam no detector com a mesma velocidade. Então, compostos que migram mais lentamente vão permanecer no detector por mais tempo resultando em uma maior área de pico. Para corrigir esse problema a área deve ser normalizada, isto é, dividida pelo tempo de migração. (ALTRIA 1993, MAYER, 2001). Entretanto, deve-se preferir utilizar como resposta a altura do pico quando os picos são altos a baixas concentrações. Por causa das inúmeras variáveis, é recomendado avaliar experimentalmente a precisão para a altura e para a área (MAYER 2001; WÄTZIG, 1995).

Foi testado experimentalmente 9 repetições genuínas, na concentração da alíquota de análise (160µg/mL de SMX e 32µg/mL de TMP) e foram avaliados os resultados em termos de desvio padrão de área normalizada e de altura. Os resultados encontram-se dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação da dispersão das diferentes formas de avaliação dos resultados para o sulfametoxazol e para a trimetoprima

Amostra	Trimetoprima				Sulfametoxazol			
	Tempo migração (min)	Área (mAU)	Área Normalizada	Altura (mAU)	Tempo migração (min)	Área (mAU)	Área Normalizada	Altura (mAU)
A1	3,72	165,0	44,35	20,3	9,71	942,8	97,10	68,3
A2	3,46	150,4	43,47	19,5	8,62	818,1	94,91	66,8
A3	3,42	152,3	44,53	20,3	8,55	819,3	95,82	69,9
A4	3,41	159,6	46,80	21,4	8,44	823,9	97,61	70,4
A5	3,38	132,5	39,20	20,5	8,28	689,9	83,32	68,8
A6	3,42	138,7	40,55	19,2	8,39	722,6	86,13	64,5
A7	3,39	148,4	43,78	20,4	8,42	766,0	90,97	67,5
A8	3,42	143,1	41,84	20,2	8,43	777,6	92,24	69,2
A9	3,44	136,6	39,71	19,3	8,46	730,1	86,30	66,0
Média	3,45	147,4	42,69	20,12	8,59	787,8	91,60	67,93
DP	0,10	10,75	2,53	0,69	0,43	74,98	5,27	1,91
CV%	2,90	7,29	5,93	3,43	5,00	9,52	5,75	2,81

Como demonstrado na Tabela 3 os CV% das alturas do pico tanto para o SMX quanto para a TMP apresentam-se menores que os CV% da área normalizada. Portanto, optou-se por trabalhar com a altura como resposta para a quantificação.

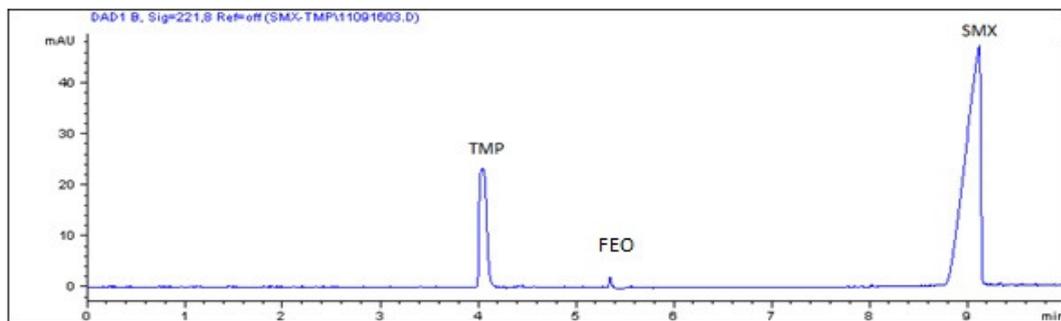
O procedimento de extração dos fármacos dos comprimidos foi baseado na Farmacopeia dos Estados Unidos (THE UNITED, 2012).

Após a otimização do método utilizou-se como eletrólito de corrida uma solução contendo tampão fosfato 15 mM, pH 6,2. O capilar foi mantido à temperatura de 25° C e aplicou-se uma diferença de potencial de 25 kV. O tempo de introdução da amostra foi de 15 segundos, utilizando-se pressão de 45 mbar, com detecção por arranjo de diodos no comprimento de onda de 221 nm. O tempo de corrida foi de 10 minutos, com tempo de migração de aproximadamente 4 minutos para a TMP e 9 minutos para o SMX, conforme Figura 9. Utilizou-se como resposta a altura do pico, pois verificou-se que a mesma tinha maior precisão que a área.

O SMX e a TMP apresentam valores de $pK_a = 5.7$ e $pK_a = 6.6$ respectivamente (O' NEIL, 1997). Segundo Boca (2007), o SMX é um anfótero, isto é, uma molécula capaz de agir como ácido ou como base, com várias possibilidades de ionização devido aos três grupos nitrogenados e um grupamento sulfonila. Utilizando um tampão no pH de 6,2, pH intermediário entre os dois fármacos, o SMX encontra-se carregado negativamente e a TMP carregada positivamente. De acordo

com Heiger (1997), sob essas condições a TMP migra mais rapidamente que o EOF e o SMX migra mais lentamente que o EOF, pois sofre atração pelo anodo. Porém, ambos migram em direção ao catodo, pois o SMX é carregado pelo EOF como apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Eletroferograma da associação de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) utilizando capilar de sílica fundida (56 cm; 75 µm d.i.), tampão fosfato 15 mM, pH 6,2 e detecção à 221 nm. O sinal analítico FEO representa o fluxo eletroosmótico.



Fonte "Chemstation Software".

2.7.2 Validação do método

2.7.2.1 Linearidade

Para utilizar o MMQO faz-se necessário a confirmação das premissas do método, caso contrário, o MMQO não pode ser realizado. As premissas são referentes aos testes de normalidade, independência e homogeneidade das variâncias dos resíduos, além da análise de variância da regressão e do desvio da linearidade dos resíduos. A Tabela 4 apresenta os resultados dos referidos testes para o SMX e a Tabela 5, para a TMP.

As premissas do método foram satisfeitas, logo, o MMQO pode ser utilizado para a confecção e o ajuste da curva analítica. Ao final, a linearidade do método foi comprovada na faixa de trabalho de 100 a 220 µg/mL para o SMX (Figura 10) e, 17 a 47 µg/mL, para a TMP (Figura 11).

Tabela 4 Resultados dos testes de premissas para a avaliação da linearidade e para a confecção da curva analítica padrão do sulfametoxazol ($\alpha=0,05$), empregando método de eletroforese capilar.

Testes estatísticos	Estatística	Padrão de SMX	Valor Crítico
Normalidade	R_{eq}	0,98	0,95
Homoscedasticidade	$t_L; p$	-1,63; $p = 0,121$	$< 2,11$; $p > 0,05$
Independência dos resíduos	D	2,82	$> d_L=1,18$; $> d_U= 1,40$
Regressão	P	$2,42 \times 10^{-22}$	$p < 0,001$
Desvio de Linearidade	P	70,2	$p > 0,05$

R = coeficiente de correlação de Ryan – Joiner; t_L = estatística t de Levene; d = estatística de Durbin – Watson; p = significância

Tabela 5 - Resultados dos testes de premissas para a avaliação da linearidade e para a confecção da curva analítica padrão da trimetoprima ($\alpha=0,05$), empregando método de eletroforese capilar.

Testes estatísticos	Estatística	Padrão de TMP	Valor Crítico
Normalidade	R_{eq}	0,97	0,95
Homoscedasticidade	$t_L; p$	$7,31 \times 10^{-3}$; $p = 0,99$	$< 2,11$; $p > 0,05$
Independência dos resíduos	D	2,70	$> d_L=1,18$; $> d_U= 1,40$
Regressão	P	$6,49 \times 10^{-20}$	$p < 0,001$
Desvio de Linearidade	P	0,83	$p > 0,05$

R = coeficiente de correlação de Ryan – Joiner; t_L = estatística t de Levene; d = estatística de Durbin – Watson; p = significância

Figura 10 - Curva analítica padrão do sulfametoxazol (SMX) em solução de metanol 50% (v:v)

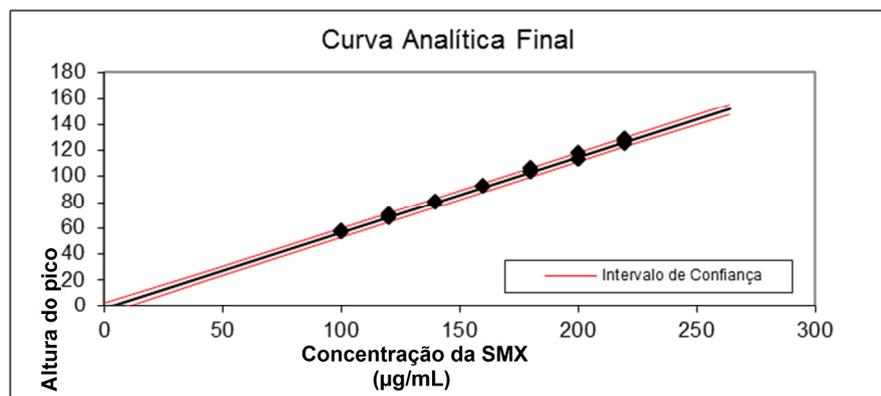
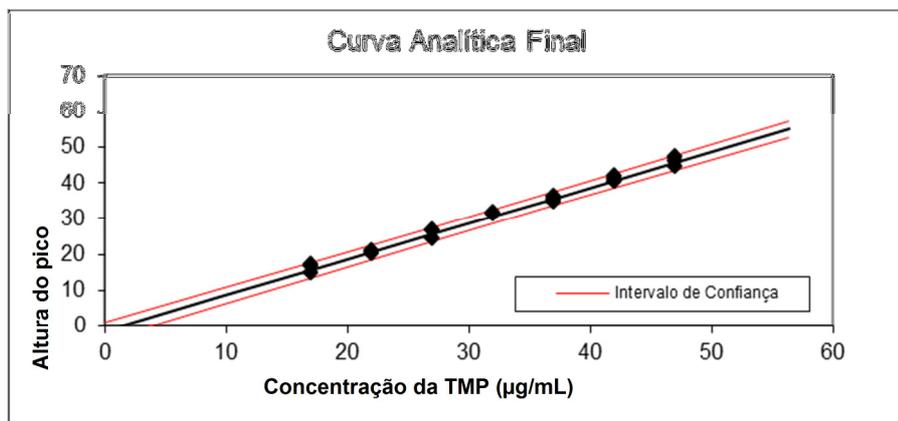


Figura 11 - Curva analítica padrão da trimetoprima (TMP) em solução de metanol 50% (v:v)



2.7.2.2 Seletividade

a) Efeito matriz

As curvas analíticas do SMX e da TMP em matriz apresentaram-se lineares. Os testes das premissas geraram resultados satisfatórios, como apresentado nas Tabelas 6 e 7, de acordo com os critérios de aceitação.

Tabela 6 - Testes de premissas para curva analítica em matriz do sulfametoxazol ($\alpha=0,05$), empregando método de eletroforese capilar

Testes estatísticos	Estatística	Padrão de SMX	Valor Crítico
Normalidade	R	0,97	0,95
Homoscedasticidade	$t_L; p$	$7,31 \times 10^{-3}; p = 9,94 \times 10^{-1}$	$< 2,11; p > 0,05$
Independência dos resíduos	D	2,70	$> d_L=1,18; > d_U= 1,40$
Regressão	P	$6,49 \times 10^{-20}$	$p < 0,001$
Desvio de Linearidade	P	$8,26 \times 10^{-1}$	$p > 0,05$

R = coeficiente de correlação de Ryan – Joiner; t_L = estatística t de Levene; d = estatística de Durbin – Watson; p = significância

Tabela 7 - Testes de premissas para curva analítica em matriz da trimetoprima ($\alpha=0,05$), empregando método de eletroforese capilar

Testes estatísticos	Estatística	Padrão de TMP	Valor Crítico
Normalidade	R	0,99	0,95
Homoscedasticidade	$t_L; p$	0,73; $p = 0,48$	$< 2,10$; $p > 0,05$
Independência dos resíduos	D	1,56	$> d_L=1,20$; $> d_U= 1,41$
Regressão	P	$2,33 \times 10^{-22}$	$p < 0,001$
Desvio de Linearidade	P	$8,16 \times 10^{-2}$	$p > 0,05$

R = coeficiente de correlação de Ryan – Joiner; t_L = estatística t de Levene; d = estatística de Durbin – Watson; p = significância

Após a confirmação das linearidades dos analitos em matriz e o cumprimento das premissas, as etapas subsequentes, como o teste de homoscedasticidade das variâncias dos resíduos e o teste t para variâncias combinadas, foram realizados (Tabela 8 e Tabela 9).

Tabela 8 - Resultados dos testes para a avaliação do efeito matriz do sulfametoxazol ($\alpha=0,05$), empregando método de eletroforese capilar

Testes estatísticos	Estatística	Calculado	Valor Crítico
Homoscedasticidade das variâncias dos resíduos	F	1,38	$< 2,17$
Teste t para variâncias combinadas	t_b, t_a	$t_b = 1,82$ $t_a = 1,44$	$< 2,02$

F = razão entre as variâncias dos resíduos de solvente e matriz; t_b = estatística t para comparação das inclinações das curvas de solvente e matriz; t_a = estatística t para comparação das intersecções das curvas de solvente e matriz

Tabela 9 - Resultados dos testes para a avaliação do efeito matriz da trimetoprima ($\alpha=0,05$), empregando método de eletroforese capilar

Testes estatísticos	Estatística	Calculado	Valor Crítico
Homoscedasticidade das variâncias dos resíduos	F	1,36	< 2,26
Teste t para variâncias combinadas	t_b, t_a	$t_b = 0,20$ $t_a = 0,02$	< 2,03

F = razão entre as variâncias dos resíduos de solvente e matriz; t_b = estatística t para comparação das inclinações das curvas de solvente e matriz; t_a = estatística t para comparação das interseções das curvas de solvente e matriz

Conforme apresentado nas Tabelas 8 e 9, os resultados permitem afirmar que, para comprimidos de SMX e TMP, o método não apresenta interferentes da matriz no método (não apresenta efeito matriz), pois, as curvas do SMX e da TMP em solvente e em matriz se equivalem estatisticamente quando analisadas em nível de significância de $\alpha=0,05$.

b) Degradação acelerada

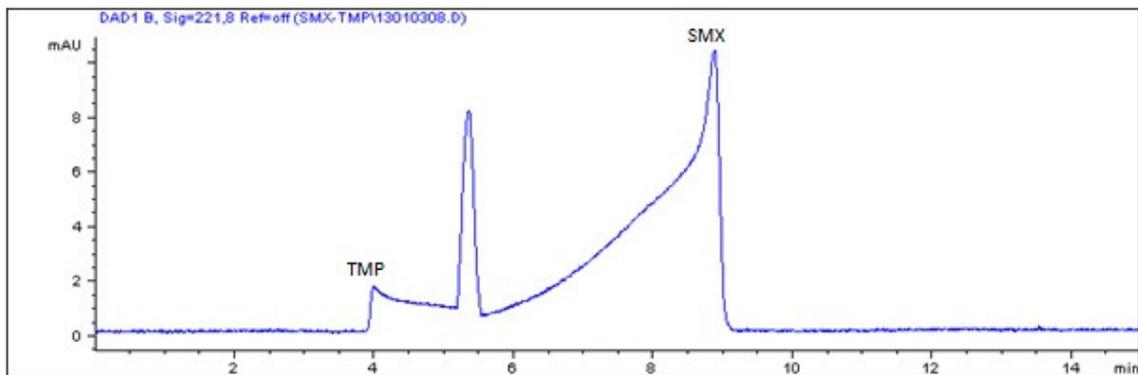
A análise das amostras submetidas às condições de degradação acelerada exibiram um significativo decréscimo da altura dos picos, acarretando diminuição do teor dos analitos, com exceção do teor de TMP submetido a oxidação, que apresentou um aumento de teor, porém não foi objeto do presente trabalho esclarecer a alteração sofrida pela TMP quando submetida à oxidação. Os resultados estão dispostos na Tabela 10. Picos adicionais foram detectados apenas nos eletroferogramas das amostras submetidas à hidrólise ácida, hidrólise básica e submetidas à agitação, como demonstrado nas Figuras 12, 13 e 14, respectivamente.

Tabela 10 - Resultados dos testes de degradação acelerada para o sulfametoxazol e para a trimetoprima

	Teor TMP(%)	Teor SMX (%)
Peróxido de hidrogênio 30%, 30 min	173,19	90,85
HCl 1M 10min	*	*
NaOH 1M 10min	*	*
HCl 1M 30min	7,37	19,72
NaOH 1M 30min	8,84	16,55
HCl 1M 60min	8,30	20,29
NaOH 1M 60min	8,50	18,36
Agitação 1h	79,23	71,83
Aquecimento 60°C por 1h	98,58	94,82
UV	101,81	75,96

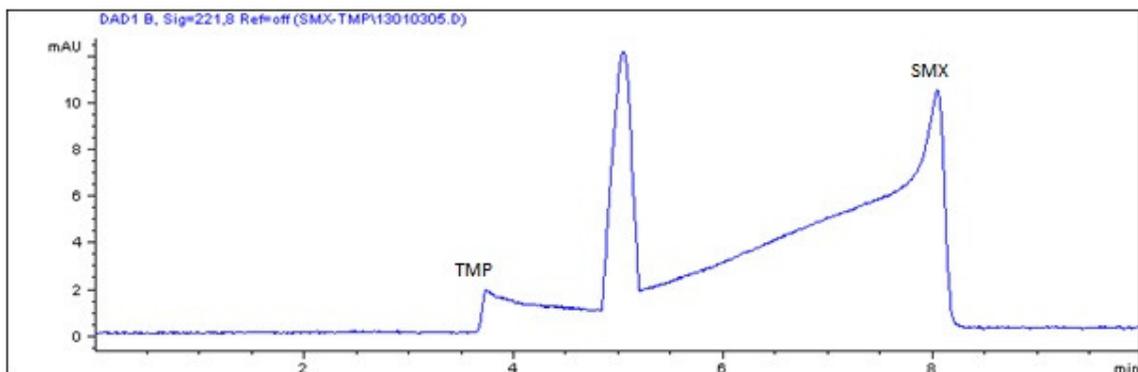
* Não foi possível calcular os teores de TMP e de SMX, pois houve alteração do perfil eletroforético.

Figura 12 - Eletroferograma da associação de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) submetidos a condições de hidrólise ácida com HCl 1N durante 1h.



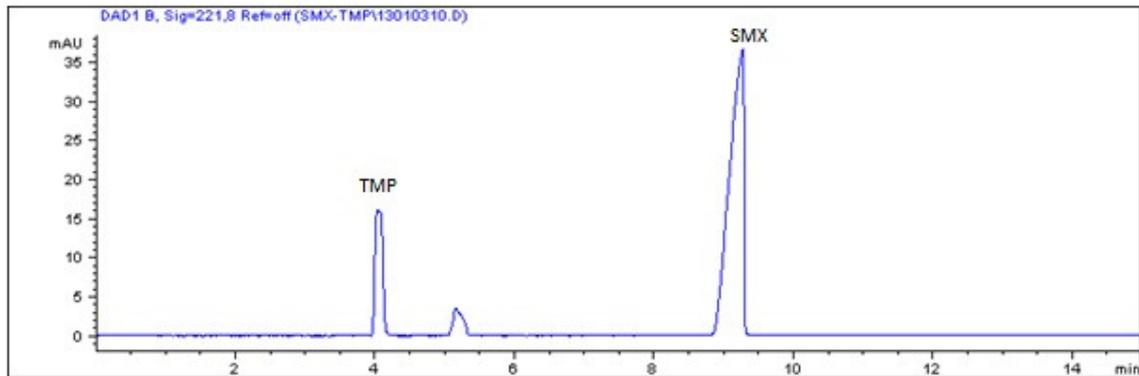
Fonte "Chemstation Software".

Figura 13 - Eletroferograma da associação de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) submetidos a condições de hidrólise básica com NaOH 1N durante 1h.



Fonte "Chemstation Software".

Figura 14 - Eletroferograma da associação de sulfametoxazol e trimetoprima submetidos à agitação em vortex durante 1h.



Fonte "Chemstation Software".

De acordo com Schmidli, quando o SMX é exposto ao HCl, a molécula sofre uma quebra sendo originado o ácido sulfanílico e 5-metil-3-amino- isoxazole.

Não foram encontrados dados na literatura a respeito dos produtos de degradação formados pela TMP.

2.7.2.3 Exatidão – Procedimento de Recuperação

O método mostrou-se exato, com valores de taxa de recuperação entre 96,7 % e 97,6 % para o SMX e entre 96,5 % e 102,4 % para a TMP, como apresentado nas Tabelas 11 e 12 respectivamente, estando estes valores dentro dos limites de 95 a 105% e de 90 a 107% estabelecidos pela União Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2002).

Tabela 11 - Avaliação da recuperação do método para o sulfametoxazol de acordo com os limites estabelecidos pela União Europeia.

Nível de Concentração	Concentração teórica (µg/mL)*	Concentração encontrada (µg/mL)*	Taxa de recuperação (%)	Critério de aceitabilidade
80%	129,4	123,3	97,6	95 a 105%
100%	161,8	156,4	96,7	
120%	194,1	188,9	97,3	

* Concentração referente à alíquota de análise (160 µg/mL de SMX e 32 µg/mL de TMP).

Tabela 12 - Avaliação da recuperação do método para a trimetoprima de acordo com os limites estabelecidos pela União Europeia.

Nível de Concentração	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)*	Concentração encontrada ($\mu\text{g/mL}$)*	Taxa de recuperação (%)	Critério de aceitabilidade
80%	25,6	26,2	102,4	90 a 107%
100%	32,0	31,6	98,8	
120%	38,4	37,0	96,5	

* Concentração referente à alíquota de análise (160 $\mu\text{g/mL}$ de SMX e 32 $\mu\text{g/mL}$ de TMP).

2.7.2.4 Precisão

A precisão foi estudada pela repetitividade, pela precisão intermediária entre dias e pela reprodutibilidade.

a) Repetitividade

Tabela 13 – Resultados da análise de 9 repetições genuínas de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) para estudo da repetitividade do método.

Amostra	Altura TMP (mAU)	Altura SMX (mAU)
A1	19,2	64,5
A2	19,3	66
A3	19,5	66,8
A4	20,2	67,5
A5	20,3	68,3
A6	20,3	68,8
A7	20,4	69,9
A8	20,5	70,2
A9	21,4	71,4
Média	20,12	68,16
s	0,69	2,19
CV _{repe} (%):	3,44	3,22
PRSD _R :	10,13	8,43
HorRat _{repe} :	0,510	0,572

Os resultados da repetitividade foram avaliados com base nos valores de razão Horwitz de repetitividade ($HorRat_r$) (HORWITZ, 1982; HORWITZ, 2006), que foram de 0,510 para o SMX e 0,572 para a TMP, sendo o critério de aceitabilidade $\leq 2,0$.

b) Precisão intermediária

A partir dos dados gerados (Tabela 14) calculou-se a média das médias dos 5 dias o desvio padrão e o somatório dos somatórios conforme Tabela 15 .

Tabela 14- Resultados da análise em triplicada durante 5 dias da trimetoprima (TMP) para a avaliação da precisão intermediária.

TMP	DIA 1	$(y_i - \bar{y})^2$	DIA 2	$(y_i - \bar{y})^2$	DIA 3	$(y_i - \bar{y})^2$	DIA 4	$(y_i - \bar{y})^2$	DIA 5	$(y_i - \bar{y})^2$
A1	22,0	8,03	25,3	0,59	23,9	0,36	26,6	0,09	19,8	0,64
A2	26,0	1,36	26,4	0,11	24,3	0,04	26,9	1,3E-29	20,8	0,04
A3	26,5	2,78	26,5	0,19	25,3	0,64	27,2	0,09	21,2	0,36
Medias	24,8		26,1		24,5		26,9		20,6	
$\Sigma (y_i - \bar{y})^2$		12,17		0,88		1,04		0,18		1,04

Tabela 15 – Resultados da análise dos dados da precisão intermediária para a trimetoprima.

Medias	24,58
Si	1,24
$\Sigma \Sigma$	15,31
CV%	5,03

A partir dos dados gerados (Tabela 16) calculou-se a média das médias dos 5 dias o desvio padrão e o somatório dos somatórios conforme Tabela 17 .

Tabela 16 - Resultados da análise em triplicada durante 5 dias do sulfametoxazol (SMX) para a avaliação da precisão intermediária.

SMX	DIA 1	$(y_i - \bar{y})^2$	DIA 2	$(y_i - \bar{y})^2$	DIA 3	$(y_i - \bar{y})^2$	DIA 4	$(y_i - \bar{y})^2$	DIA 5	$(y_i - \bar{y})^2$
A1	61	46,69	70,1	1,36	64,4	4,84	66,9	15,73	58,5	2,45
A2	70,9	9,40	71,5	0,05	66,7	0,01	72,7	3,36	59,9	0,03
A3	71,6	14,19	72,2	0,87	68,7	4,41	73	4,55	61,8	3,00
Medias	67,8		71,3		66,6		70,9		60,1	
$\sum (y_i - \bar{y})^2$		70,29		2,29		9,26		23,65		5,49

Tabela 17 - Resultados da análise dos dados da precisão intermediária para o sulfametoxazol.

Medias	67,33
Si	3,33
$\sum \sum$	110,97
CV%	4,95

A precisão entre dias foi avaliada com base no CV%, apresentando resultados de 5,03% para a TMP e 4,95% para o SMX, sendo esses valores considerados satisfatórios, com base nos critérios de aceitação (inferiores a 8%) (AOAC, 1998).

c) Reprodutibilidade

Os laboratórios geraram dados em termos de quantificação dos fármacos SMX e TMP em comprimidos, sendo os cálculos realizados a partir de uma curva analítica das substâncias químicas de referências respectivas. O procedimento foi realizado conforme Anexo A. Os dados gerados foram tratados para a verificação de valores aberrantes e os resultados estão dispostos nas Tabelas 18 e 19.

Tabela 18 - Resultados do estudo colaborativo das análises da quantificação de trimetoprima (TMP) em comprimidos com a associação de SMX +TMP (400 mg+ 80mg) por eletroforese capilar modo CZE.

	Laboratório 1* (µg/mL)	Laboratório 2* (µg/mL)	Laboratório 3* (µg/mL)	Laboratório 4* (µg/mL)	Laboratório 5* (µg/mL)
	28,33	25,29	28,79	30,83	36,00
	28,48	27,39	30,56	30,99	36,00
	29,40	28,88	30,80	31,15	36,85
Médias	28,73	27,19	30,05	30,99	36,28
DP	0,579	1,808	1,098	0,160	0,491

* Teor calculado a partir da concentração da alíquota de análise.

A partir das médias de cada laboratório foi calculada a média das médias, o desvio padrão das médias e o coeficiente de variação percentual das médias (CV%). Esses valores foram tratados para verificação de dados aberrantes e não houve dados aberrantes. Em seguida o CV% foi comparado com a razão de Horwitz de reprodutibilidade (HorRat_R), que apresentou resultado de 1,25 para a TMP. Para o estudo de reprodutibilidade os limites de aceitação devem ser inferiores ou iguais a dois (INMETRO , 2011). Os cálculos estão apresentados abaixo da Tabela 19. A média, o desvio padrão e o CV% estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Médias, desvios padrões e coeficientes de variação de teores de trimetoprima (TMP) em comprimidos com a associação de SMX e TMP (400 mg + 80 mg) obtidos dos laboratórios participantes do estudo colaborativo.

Laboratórios	Médias (µg/mL) *
1	28,73
2	27,19
3	30,05
4	30,99
5	36,85
Média	30,76
DP	3,69
CV%	12,00

* Teor calculado a partir da concentração da alíquota de análise (160 µg/mL de SMX e 32 µg/mL de TMP).

$CV\%Hor = 2C^{-0,1505}$, sendo C a média das concentrações em fração de massa

$$CV\%Hor = 2(30,76 \times 10^{-6} \text{ug/mL})^{-0,1505}$$

$$CV\%Hor = 9,55$$

$$HorRat_R = \frac{CV\%_{exp}}{CV\%_{Hor}}$$

$$HorRat_R = \frac{12,00}{9,55} = 1,25$$

Para o SMX os resultados estão dispostos na Tabela 20.

Tabela 20 - Resultados do estudo colaborativo das análises da quantificação de SMX em comprimidos com a associação de SMX +TMP (400 mg+ 80mg) por eletroforese capilar modo CZE.

	Laboratório 1*	Laboratório 2*	Laboratório 3*	Laboratório 4*	Laboratório 5*
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
	143,49	147,40	157,20	150,49	155,21
	147,20	155,61	164,42	152,13	152,48
	149,56	155,84	169,04	155,64	156,02
Médias	146,85	155,72	163,55	152,55	154,57
DP	2,90	4,80	5,96	2,63	1,85

* Teor calculado a partir da concentração da alíquota de análise, (160 µg/mL de SMX e 32 µg/mL de TMP).

A partir das médias de cada laboratório foi calculada a média das médias, o desvio padrão das médias e o coeficiente de variação percentual das médias (CV%). Esses valores foram comparados à razão de Horwitz de reprodutibilidade ($HorRat_R$), que apresentou resultado de 0,52. Para o estudo de reprodutibilidade, os limites de aceitação devem ser inferiores ou igual a dois. A média das médias, o desvio padrão

das médias e o CV% das médias estão apresentados na Tabela 21. Os cálculos do CV% estão dispostos abaixo da Tabela 21.

Tabela 21 - Médias, desvios padrões e coeficientes de variação de teores de SMX em comprimidos com a associação de SMX e TMP (400 mg + 80 mg) obtidos dos laboratórios participantes do estudo colaborativo.

Laboratórios	Médias*
1	146,85
2	155,72
3	163,55
4	152,75
5	154,57
Média	154,69
DP	6,01
CV%	3,89

* Teor calculado a partir da concentração da alíquota de análise (160 µg/mL de SMX e 32 µg/mL de TMP).

$CV\%_{Hor} = 2C^{-0,1505}$, sendo C a média das concentrações em fração de massa

$$CV\%_{Hor} = 2(154,69 \times 10^{-6} \text{ug/mL})^{-0,1505}$$

$$CV\%_{Hor} = 7,47$$

$$HorRat_R = \frac{CV\%_{exp}}{CV\%_{Hor}}$$

$$HorRat_R = \frac{3,89}{7,47} = 0,52$$

Os resultados gerados permitem afirmar que o método possui significativa reprodutibilidade, pois apresentou um valor de $HorRat_R$ para a TMP de 1,25, valor inferior ao limite que é de 2. Para o SMX o $HorRat_R$ foi de 0,52 e o limite foi de 2.

2.7.2.5 Robustez

A robustez foi avaliada através de pequenas modificações nos parâmetros do método, observando-se pequenas alterações nos tempos de migração. Para a análise dos dados foi aplicado o teste *t* para amostras pareadas, conforme Tabela 22 e Tabela 23. As variâncias foram previamente avaliadas, apresentando-se homogêneas.

Tabela 22 - Resultados das variações dos parâmetros do método de eletroforese capilar modo CZE na avaliação da robustez para a determinação de trimetoprima

Parâmetro	Variação do parâmetro	Concentração Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Teste <i>t</i>	Valor de Referência ($\alpha=0,05$)
Comprimento de onda	214 nm	32,38	0,001	
	*221 nm	31,49	*	
	254 nm	31,06	0,612	
Diferença de potencial	20 kV	31,72	0,718	
	*25 kV	31,49	*	
	30 kV	31,80	0,437	
Tempo de introdução	10 s	30,95	0,911	
	15 s	31,10	*	
	20 s	32,16	0,382	-4,303 a
Molaridade do tampão	10 mM	30,99	0,929	4,303
	*15 mM	31,10	*	
	20 mM	31,50	0,417	
Temperatura do cassete	20 °C	32,16	0,120	
	*25 °C	31,49	*	
	30 °C	32,19	0,267	
pH do tampão	6,0	31,49	0,721	
	*6,2	32,11	*	
	6,4	30,00	0,140	

*Parâmetro utilizado para comparação

Tabela 23 - Resultados das variações dos parâmetros do método de eletroforese capilar modo CZE na avaliação da robustez para a determinação de sulfametoxazol

Parâmetro	Variação do parâmetro	Concentração Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Teste t	Valor de Referência ($\alpha=0,05$)
Comprimento de onda	214 nm	169,12	0,087	
	*221 nm	163,14	*	
	254 nm	160,70	0,301	
Diferença de potencial	20 kV	158,53	0,261	
	*25 kV	163,14	*	
	30 kV	156,18	0,001	
Tempo de introdução	10 s	155,82	0,599	
	*15 s	152,23	*	
	20 s	152,90	0,000	-4,303 a
Molaridade do tampão	10 mM	170,91	0,064	4,303
	*15 mM	152,23	*	
	20 mM	166,90	0,267	
Temperatura do cassete	20 °C	145,84	0,228	
	*25 °C	150,21	*	
	30 °C	158,80	0,032	
pH do tampão	6,0	166,20	0,804	
	*6,2	164,51	*	
	6,4	157,77	0,229	

*Parâmetro utilizado para comparação

Os resultados permitem afirmar que o método possui robustez adequada, com $\alpha=0,05$. Portanto pequenas e deliberadas modificações nos parâmetros do método não alteram significativamente a resposta em termos de quantificação do SMX e da TMP.

3 CONCLUSÃO

- Os resultados da validação demonstraram que o método possui significativa linearidade, precisão e exatidão.
- Para comprimidos de sulfametoxazol e trimetoprima o método não apresenta efeito matriz, isto é, não apresenta interferentes da matriz no método.
- O método proposto de eletroforese capilar de zona livre pode ser aplicado para a análise quantitativa de sulfametoxazol e trimetoprima em comprimidos, contribuindo para aprimorar o controle de qualidade das formulações farmacêuticas, garantindo eficácia e segurança terapêutica.
- Ademais, pode contribuir para a redução do uso de solventes orgânicos nas técnicas analíticas, gerando menos resíduos e menos danos à saúde do trabalhador, podendo até mesmo reduzir os custos das análises de controle de qualidade do medicamento.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia Para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 jun. 2003. Seção 1, p. 56.

ALSANTEA, K. M. et al. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V.59, n.1, p. 29-37, jan. 2007.

ALTRIA K. D. Overview of capillary electrophoresis and capillary Electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam ,v. 856, p. 443–463, set. 1999.

ALTRIA, K. D. Essential Peak Area Normalisation for Quantitative Impurity Content Determination by Capillary Electrophoresis. *Chromatographia*, Wiesbaden, v. 35, n. 3/4, p. 177-182, fev. 1993.

AMINI H. et al. Rapid and simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Oxford, v. 43, p. 1146–1150, fev. 2007.

AOAC. **Peer-Verified Methods Program**, Manual on policies and procedures, Arlington, 1998.

BEDOR D.C.G. et al. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in biological fluids for high-throughput analysis: Comparison of HPLC with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 863, p. 46–54, jan. 2008.

BELSEY, D. A. et al. **Regression diagnostics: identifying influential data and sources of colinearity**, New York: Wiley, 1980.

BOCA, M. B. et al. Assessment of MEKC suitability for residue drug monitoring on pharmaceutical manufacturing equipment. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Oxford, v. 46, p. 631-638, nov. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei 9.782, de 26 de janeiro de 1999, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jan. 1999. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990. Seção 1, p. 18055.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 532, de 28 de março de 2012. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 mar. 2012. Seção 1, p. 96.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 4.004, de 16 de dezembro de 2010. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 dez. 2010. Seção 1 p. 109.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 4217, de 28 de dezembro de 2010. Componente Básico da Assistência Farmacêutica. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 dez. 2010. Seção 1, p. 72.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Recomendações para Terapia Antirretroviral em Crianças e Adolescentes Infectados pelo HIV**. 1. ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust Tests for the Equality of Variances. **Journal of the American Statistical Association**. Londres, v. 69, n. 364 , p. 364-367 jul. 1973.

BRUNTON, L. L. CHABNER, B. A., KNOLLMANN B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. National Institutes Of Health. **Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections among HIV-exposed and HIV-infected children**. Rockville, 2009.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 3. Ed. New York: Wiley, 1998.

DURBIN J.; WATSON G. S. Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression. **Biometrika** v. 38, n. 1-2, p. 159-178, 1951.

FAN L. Y. et al. Separation and determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations by a microfluidic capillary electrophoresis system with a continuous sample introduction interface. **Journal of Separation Sciences**, v. 26, p. 1376-1382, set. 2003.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. Ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2.v.

FARMANGUINHOS. Nossos medicamentos. Rio de Janeiro, 10 set. 2009.

Disponível em :

http://www2.far.fiocruz.br/farmanguinhos/index.php?option=com_content&view=article&id=74&Itemid=90. Acesso em : 02 jan. 2012.

HEIGER, D. N. **High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction**. 3. Ed. França: Hewlet Packard Company, 1997.

HONG Y. et al. Inhibition of Recombinant Pneumocystis carinii Dihydropteroate Synthetase by Sulfa Drugs. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Washington, v. 39, p. 1756–1763, ago. 1995.

HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 54, n. 1, p. 67 A -76 A, 1982.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. **Pure and Applied Chemistry**. Oxford, v.67, n.2, p.331 - 343, 1995.

HORWITZ, W. ALBERT, R. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International*. Arlington, v. 89, n. 4, p. 1095, ago. 2006.

ICH International Conference On Harmonization. **Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, Geneva, 2005

INMETRO. **DOQ-CGRE-008**: Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, Rio de Janeiro, 2011.

LANDERS, J. P. **Handbook of Capillary Electrophoresis**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1996.

LEVENE, H. Robust Tests for Equality of Variances. In: OLKIN, I et al. **Contributions to probability and statistics**. 1 ed. California: Stanford University Press, 1960, cap. 25. Métodos Analíticos, Rio de Janeiro, 2011.

MAYER, B. X. How to increase precision in capillary electrophoresis. . **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 907, p. 21-37, out. 2001.

MIKKERS, F. E. P., EVERAERTS, F. M., VERHEGGEN. T. P. E. M., High performance zone electrophoresis, **Journal of Chromatography A**. Amsterdam v. 169, n. 11, p. 11-20, fev. 1979.

NEVADO J. J. B. et al. Determination of sulfametoxazole, sulfadiazine and associated compounds in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 918, p. 205–210, 2001.

O' NEIL. M. J. et al. **The Merck Index**, 13 ed. Nova Jersey, Merck & Co., 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Guidelines on Co-trimoxazole prophylaxis for VIH-related infections among children, adolescents and adults, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/ctxguidelines.pdf>. Acesso em 2 de Nov. 2010.

RYAN, T. A.; JOINER, B. L.; Normal probability plots and tests for normality. Technical Report, Statistics Department, **The Pennsylvania State University**. 1976. Disponível em: http://www.minitab.com/uploadedFiles/Shared_Resources/Documents/Articles/normal_probability_plots.pdf. Acesso em dez. 2012.

SCHMIDLI, B., Hoffman-La Roche Inc., Unpublished Data

SOUZA, S. V. C., JUNQUEIRA, R.G., A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.552, p. 25-35, nov. 2005

TESHIMA D. et al. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in human plasma by capillary zone electrophoresis. **Biomedical Chromatography**, v. 18, p. 51-54, 2004.

THE UNITED States Pharmacopoeia 35. Rockville: U. S. Pharmacopeia, 2012.

THE WORLD BANK. AIDS-SUS (National AIDS Program - National Health Service), 2003. Disponível em:
<http://web.worldbank.org/external/projects/main?Projectid=P113540&theSitePK=40941&piPK=73230&pagePK=64283627&menuPK=228424>. Acesso em: 3 de nov. 2010.

THOMPSON, M. et al. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 145-196, 2006.

UNIÃO EUROPEIA (UE): **Directiva 06/26/EC da Comissão**, Official Journal European Union. 2002.

WÄTZIG, H. Appropriate calibration functions for capillary electrophoresis I. Precision and sensitivity using peak areas and heights. . **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 700, p. 1-7, 1995.

ANEXO A – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA EM COMPRIMIDOS

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de aplicação
3. Definições
4. Siglas
5. Condições gerais
6. Condições específicas
7. Anexo
 - A. Preparo de curva analítica de sulfametoxazol e de trimetoprima
 - B. Determinação de sulfametoxazol e de trimetoprima em comprimidos

1. OBJETIVO

Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas para a determinação do teor dos princípios ativos sulfametoxazol e de trimetoprima em comprimidos, analisados pela técnica de eletroforese capilar com detector por arranjo de diodos.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP se aplica na determinação do teor de sulfametoxazol e de trimetoprima em comprimidos.

3. DEFINIÇÕES

Para efeito deste POP, são adotadas as seguintes definições:

3.1 – Comprimidos de sulfametoxazol e de trimetoprima: no caso deste POP, consideram-se apenas os comprimidos de dose fixa, contendo em sua composição os princípios ativos sulfametoxazol, com concentração de 400 mg/cpd e trimetoprima, com concentração de 80 mg/cpd.

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

Cpds - Comprimidos

EC - Eletroforese capilar

CZE - Eletroforese em zona livre

SMX Sulfametoxazol

TMP Trimetoprima

5. CONDIÇÕES GERAIS

A determinação do teor de sulfametoxazol e de trimetoprima em comprimidos é realizada por análise em eletroforese capilar da solução de extração da amostra de comprimidos pulverizados como será mencionado mais adiante neste POP.

6. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

6.1 – Materiais

- a) Pipeta automática de 1 mL calibrada;

- b) Pipeta automática de 100 μ L calibrada;
- c) Balões volumétricos com capacidade para 50 mL, 100 mL e 500 mL calibrados;
- d) Provetas graduadas de 250 mL
- e) Capilar de sílica fundida: 64,5 cm de comprimento total (56 cm de comprimento efetivo) x 75 μ m de diâmetro interno.

6.2 – Equipamentos

- a) Balança analítica de resolução 0,01 mg calibrada;
- b) Equipamento de eletroforese capilar HP^{3D} CE, com detector por arranjo de diodos (DAD), equipado com controle de temperatura por ar forçado, eletrodos de platina e “Chemstation Software” qualificado;
- c) Gral e pistilo;
- d) Banho ultra-som;
- e) Membrana filtrante de 0,22 μ m.

6.3 – Padrões e reagentes

- a) Padrão de sulfametoxazol;
- b) Padrão de trimetoprima;
- c) Metanol grau para CLAE;
- d) Fosfato de sódio monobásico;
- e) Água grau reagente tipo I;
- f) Soluções aquosas de hidróxido de sódio 0,1 N e 1 N.

6.4 – Preparo das soluções tampão de fosfato de sódio monobásico

6.4.1 – Solução 15 mM fosfato de sódio monobásico pH = 6,2 (eletrólito de corrida)

Pesar 0,8999 g de fosfato de sódio monobásico e diluir com aproximadamente 450 mL de água em balão volumétrico de 500 mL. Submeter a solução ao ultrassom por 5 minutos e ajustar o pH para 6,2 com solução de NaOH 1 N. Aferir o volume do balão. Filtrar a solução resultante com membrana filtrante de 0,22 μ m.

Nota:

Armazenar a solução tampão em embalagem de polietileno ou vidro com tampa que não contenha sílica por 1 a 2 semanas.

6.4.2 – Solução de metanol 50% (v:v)

Em 2 provetas graduadas de 250 mL transferir 250 mL de água para uma e 250 mL de metanol para outra em seguida misturar a água e o metanol em béquer.

6.5 – Condições analíticas de eletro migração no modo CZE

- a) Diferença de potencial: 25 kV;
- b) Temperatura do cassete: 25° C;
- c) Comprimento de onda (DAD): monitorar em 221 nm;
- d) Modo de introdução das amostras: hidrodinâmica por pressão a 45 mbar/15s;
- e) Eletrólitos: soluções contendo 15 mM de fosfato de sódio monobásico no pH 6,2.
- f) Condicionamento entre corridas: 1 min de NaOH 0,1 N; 2 min de água; 3 min de tampão;
- g) Condicionamento inicial do dia: 30 min de NaOH 0,1 N; 10 min de água; 20 min de tampão;
- h) O tempo de análise é de 10 min com tempo de migração de aproximadamente 4 min para a TMP e 9 min para o SMX.

Nota:

As condições descritas acima são relativas ao equipamento de eletroforese capilar modelo HP ^{3D} CE com detector por conjunto de diodos equipado com o respectivo capilar de sílica nas dimensões 64,5 cm x 75 µm. Para outros equipamentos e/ou capilares devem ser efetuadas modificações segundo as necessidades operacionais.

6.6 – Preparo das soluções padrão

6.6.1– Soluções padrão estoques de sulfametoxazol

Medir em balança analítica calibrada 3 massas de 50,00 mg do padrão de sulfametoxazol e transferí-las, quantitativamente, com auxílio de 10 mL da solução de metanol 50% (v:v) para balões volumétricos de 50 mL calibrados. Agitar e levar ao ultrassom por 5 min. Em seguida aferir os balões volumétricos com a solução de metanol 50% (v:v) e homogeneizar as soluções. Após as correções de pesagem e consideração do volume real dos balões utilizados, a concentração final das soluções será, aproximadamente, 1000 µg/mL. As soluções padrão estoques de sulfametoxazol devem ser nomeadas como: S1, S2 e S3.

6.6.2 – Preparo das soluções padrão de trabalho de sulfametoxazol

De cada solução estoque (S1, S2 e S3) tomar alíquotas de 100, 160 e 220 µL introduzindo as mesmas em tubos tipo eppendorf de 1 mL. Adicionar 780 µL de tampão fosfato de sódio monobásico 15 mM, pH 6,2 em todas as soluções e completar o volume para 1 mL com a solução de metanol 50% (v:v). A Tabela 1 apresenta as concentrações finais, alíquotas tomadas das soluções estoques e volumes da solução de metanol 50% (v:v) a serem adicionados.

Tabela 1: Preparo das soluções padrão de trabalho de sulfametoxazol

Nível	Conc. Nominal (µg/mL)	Alíquota da solução estoque (µL)	Solução de metanol 50% (v:v) na alíquota	Adição de tampão (µL)
1	100	100,0	120,0	780,0
2	160	160,0	60,0	780,0
3	220	220,0	-	780,0

Nota:

As identificações dos balões devem ser registradas no formulário *Preparo de Curva Analítica de Sulfametoxazol/Trimetoprima* (Anexo A).

6.6.3 – Soluções padrão estoques de trimetoprima

Medir em balança analítica calibrada 3 massas de 50,00 mg do padrão de trimetoprima e transferí-las, quantitativamente, com auxílio de 10mL da solução de metanol 50% (v:v) para balões volumétricos de 50 mL calibrados. Agitar e levar ao

ultrassom por 5 min. Em seguida aferir os balões volumétricos com a solução de metanol 50% (v:v) e homogeneizar as soluções. Após as correções de pesagem e consideração do volume real do balão utilizado, a concentração final das soluções será, aproximadamente, 1000 µg/mL. As soluções padrão estoques de trimetoprima devem ser nomeadas como: T1, T2 e T3.

6.6.4 – Preparo das soluções padrão de trabalho de trimetoprima

De cada solução estoque (T1, T2 e T3) tomar alíquotas de 17,0, 32,0, e 47,0 µL introduzindo as mesmas em tubos tipo eppendorf de 1mL. Adicionar 780,0 µL de tampão fosfato de sódio monobásico 15 mM, pH 6,2 em todas as soluções e completar o volume para 1 mL com a solução de metanol 50% (v:v). A tabela 2 apresenta as concentrações finais, alíquotas tomadas das soluções estoques e volumes da solução de metanol 50% (v:v) a serem adicionados

Tabela 2: Preparo das soluções de trabalho de trimetoprima

Nível	Conc. Nominal (µg/mL)	Alíquota da solução estoque (µL)	Solução de metanol 50% (v:v) na alíquota	Adição de tampão (µL)
1	17	17,0	203,0	780,0
2	32	32,0	188,0	780,0
3	47	47,0	173,0	780,0

Nota:

As identificações dos balões devem ser registradas no formulário *Preparo de Curva Analítica de Sulfametoxazol/Trimetoprima* (Anexo A).

6.6.5 – Confecção da curva analítica

Nas condições de operação indicadas no item 6.5, introduzir no equipamento de eletroforese capilar cada solução padrão de trabalho, agrupadas por concentração nominal e em ordem aleatória de níveis, para obter a curva analítica com os níveis de concentração nominal de cada princípio ativo. Integrar as alturas dos picos correspondentes aos tempos de migração dos analitos e registrar os valores na planilha “Planilha para Curva Analítica”.

6.7 – Preparo da amostra

6.7.1 – Amostragem

Tomar vinte comprimidos e pulverizar com auxílio de um gral e pistilo. Seqüencialmente, homogeneizar o pó finamente dividido por 10 min. Calcular o peso médio dos comprimidos.

Pesar, em triplicata, o equivalente a 100 mg de sulfametoxazol do pó dos comprimidos pulverizados e transferir para balões volumétricos com capacidade de 100 mL com auxílio de aproximadamente 90 mL da solução de metanol 50% (v:v) e colocar no banho de ultrassom por 5 min. Em seguida aferir os balões volumétricos com a solução de metanol 50% (v:v). As soluções estoques da amostra devem ser nomeadas como: A1, A2 e A3.

Nota: O cálculo é feito com base no sulfametoxazol, assim a concentração final da solução estoque da amostra é 1mg/mL de sulfametoxazol e 0,2 mg/mL de trimetoprima.

6.7.3 - Preparo da solução de trabalho da amostra

De cada solução estoque (A1, A2 e A3) tomar alíquotas de 160 µL introduzindo as mesmas em tubos tipo eppendorf de 1mL. Adicionar 780 µL de tampão fosfato de sódio monobásico 15 mM, pH 6,2 e 60 µL de metanol 50% (v:v) em todas as soluções. Filtrar com filtro 0,22 µm. A concentração final das soluções é 160 µg/mL de sulfametoxazol e 32 µg/mL de trimetoprima.

Nota:

As identificações dos balões devem ser registradas no formulário *Determinação de sulfametoxazol e trimetoprima em comprimidos* (Anexo B).

6.8 Preparo do branco dos solventes

Transferir para tubo tipo eppendorf 780 µL de tampão fosfato de sódio monobásico e 220 µL de solução de metanol 50% (v:v). Filtrar com filtro 0,22 µm.

6.9 – Preparo da batelada de análise

Colocar na bandeja de eletroforese capilar uma amostra em branco e em seguida aleatoriamente os frascos de análise contendo:

- a) as soluções padrão do primeiro ponto da curva (S11, S12, S13, T11, T12 e T13);
- b) as alíquotas das soluções de extração provenientes do procedimento da amostra (A1, A2 e A3);
- c) as soluções padrão do segundo ponto da curva (S21, S22, S23, T21, T22 e T23);
- d) as soluções padrão do terceiro ponto da curva (S31, S32, S33, T31, T32 e T33).

Introduzir cada solução nas condições descritas no item 6.5 Integrar as alturas dos picos correspondentes aos tempos de retenção de sulfametoxazol e trimetoprima.

6.10 – Determinação do teor de sulfametoxazol e trimetoprima (µg/mL)

As quantificações dos analitos em questão, em µg/mL serão feitas através da planilha por interpolação da altura dos picos cromatográficos na curva analítica.

6.11.1 – Cálculos dos parâmetros de regressão

$$A = bC(\mu\text{g/mL}) + a$$

Então a concentração (µg/mL) de ativos serão calculados por:

$$C(\mu\text{g/mL}) = \frac{A - a}{b}$$

Onde: A = altura do pico eletroferográfico correspondente às substâncias em análise (sulfametoxazol ou trimetoprima)
a = interseção da equação da reta obtida pela curva analítica

- b = inclinação da equação da reta obtida pela curva analítica
 C = Concentração de sulfametoxazol ou trimetoprima

6.12.2 – Cálculo do teor dos ativos na amostra

6.12.2 – Para o sulfametoxazol

$$\frac{C_t}{C} = \frac{100\%}{T(\%)}$$

Onde C_t é a concentração teórica (160 µg/mL), C é a concentração real encontrada e T(%) é o teor de princípio ativo sulfametoxazol encontrado no comprimido.

6.12.2.2 – Para a trimetoprima

$$\frac{C_t}{C} = \frac{100\%}{x}$$

Onde C_t é a concentração teórica (32 µg/mL), C é a concentração real encontrada e T(%) é o teor de princípio ativo trimetoprima encontrado no comprimido.

ANEXO A

PREPARO DE CURVA ANALÍTICA DE SULFAMETOXAZOL/TRIMETOPRIMA

Identificação

Data de Confeção da Curva		Código de Identificação da Curva	
N° de Lote do Solvente			
Validade do Solvente		Identificação do pipetador	
Capilar		Eletroforese Capilar	

Soluções Estoques de sulfametoxazol

Solução	Identificação do Balão	Concentração (µg/mL)
S1		
S2		
S3		

Soluções Estoques de trimetoprima

Solução	Identificação do Balão	Concentração (µg/mL)
T1		
T2		
T3		

Curva Analítica sulfametoxazol

Solução	Solução Estoque	Volume da Alíquota (µL)	Vol. Final da Solução (µL)	Concentração (µg/mL)
S1.1	S1			
S1.2				
S1.3				
S2.1	S2			
S2.2				
S2.3				
S3.1	S3			
S3.2				
S3.3				

Curva Analítica trimetopríma

Solução	Solução Estoque	Volume da Alíquota (μL)	Vol. Final da Solução (μL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
T1.1	T1			
T1.2				
T1.3				
T2.1	T2			
T2.2				
T2.3				
T3.1	T3			
T3.2				
T3.3				

ANEXO B

DETERMINAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL/TRIMETOPRIMA EM COMPRIMIDOS

Batelada Analítica		Data de Análise	
Local		Setor	
Eletroforese Capilar		Código do Equipamento	
Coluna		Curva Analítica N°	
Identificação da Balança		Data de Confecção da Curva	

Solventes e Soluções Utilizadas

	Solventes	Marca	Lote	Validade
A				
B				

	Soluções	Identificação	Data do Preparo	Validade
A				
B				

Soluções Estoque da amostra

Solução	Identificação do Balão	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
A1		
A2		
A3		

Solução de Trabalho da amostra

Amostra N°		Volume da Aliquota (µL)	Vol. Final de Solução (µL)	Concentração (µg/mL)
A1 SMT	A1			
	A2			
	A3			
A1 TMP	A1			
	A2			
	A3			
A2 SMT	A1			
	A2			
	A3			
A2 TMP	A1			
	A2			
	A3			
A3 SMT	A1			
	A2			
	A3			
A3 TMP	A1			
	A2			
	A3			

Sequência de Análise dos Níveis da Curva Analítica:

--

Observações:

--

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____
 Data: _____