UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de técnicas miniaturizadas de preparação de amostras na análise enantiosseletiva de fármacos quirais com diferentes características ácido-base em meio microssomal e aplicação em estudos de metabolismo *in vitro*.

Rodrigo Almeida Simões

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação de técnicas miniaturizadas de preparação de amostras na análise enantiosseletiva de fármacos quirais com diferentes características ácido-base em meio microssomal e aplicação em estudos de metabolismo *in vitro*.

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Rodrigo Almeida Simões

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

Ribeirão Preto
2012

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

Simões, Rodrigo Almeida

Avaliação de técnicas miniaturizadas de preparação de amostras na análise enantiosseletiva de fármacos quirais com diferentes características ácido-base em meio microssomal e aplicação em estudos de metabolismo *in vitro*. Ribeirão Preto, 2012.

160 p.: il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Bonato, Pierina Sueli

1. Técnicas de microextração. 2. Análise enantiosseletiva. 3. Metabolismo *in vitro*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodrigo Almeida Simões

Avaliação de técnicas miniaturizadas de preparação de amostras na análise enantiosseletiva de fármacos quirais com diferentes características ácido-base em meio microssomal e aplicação em estudos de metabolismo *in vitro*.

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatórias

À minha mãe, Ângela. Por me fazer sentir sempre o poder de um amor incondicional.

À minha amada Ana Carolina. As coisas lindas são tão mais lindas quando você está.

Agradecimentos

Agradeço profundamente a Deus por sempre iluminar o meu caminho com a luz do Seu amor.

À minha família, em especial à minha mãe, por sempre apoiar as minhas decisões, mesmo que estas escolhas gerem o sofrimento da distância, *Te amo;* e ao meu padrasto, Jailton, pelo incentivo de sempre.

À minha companheira de todas as horas, Ana Carolina. Seu amor, amizade e dedicação me deram forças para enfrentar todos os desafios com coragem e confiança. *Estranho seria se eu não me apaixonasse por você...*

À minha orientadora, Professora Dra. Pierina. Uma das coisas que um aluno de Pós-Graduação mais precisa é poder contar com seu orientador. Pois bem, eu pude contar com a senhora. O seu profissionalismo e enorme conhecimento técnico me deram segurança por toda a jornada do Doutorado. Tenho e terei muito orgulho em dizer que fui orientado pela senhora.

Ao Professor Dr. Anderson. Dizem que uma das melhores coisas nos amigos é que você pode escolhê-los. Eu dei sorte duas vezes, pois escolhi um amigo e ganhei um "co-orientador" (está entre aspas porque não foi oficial, mas nem por isso menos efetivo). Muito obrigado por todos os conselhos e discussões construtivas, com você pude exercer meu espírito crítico (teimosia) nos mais altos níveis. Também quero agradecer aos outros componentes da Família de Oliveira (Fran e Clarinha), pois vocês foram minha referência de família por um bom período do tempo em que vivi em Ribeirão Preto. A convivência com vocês foi extremamente importante pra mim.

A todos os meus companheiros do CROEC, alunos e ex-alunos da Profa. Dra. Pierina; alunos do Prof. Dr. Anderson e da Profa. Dra. Christiane; e os técnicos de laboratório. Todos contribuíram para a construção da "atmosfera de conhecimento" que tem o CROEC. Eu também gostaria de agradecer de maneira especial ao Thiago Barth, Leandro Calixto, Milena Tonon e Valquíria Jabor pela colaboração diária com o meu trabalho. Durante os últimos 4 anos tive o grande prazer em compartilhar não só o laboratório com vocês, mas também as angustias e felicidades da minha vida. Muito obrigado por todos os momentos que passamos juntos. Como foi bom ter trabalhado com vocês!

Ao Prof. Dr. Janusz Pawliszyn, por permitir que eu realizasse um estágio no seu grupo de pesquisa, na Universidade de Waterloo, Waterloo, Canadá. Também gostaria de agradecer a todos os componentes do grupo do Prof. Pawliszyn pela colaboração com o meu trabalho.

Às funcionárias do Departamento de Física e Química, Luciana, Perpétua, Laila e Rosana.

Às funcionárias da seção de Pós-Graduação, Rosana, Rose e Ana. Sempre dispostas a colaborar.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

O Universo é assimétrico e estou persuadido de que a vida, como nós a conhecemos, é resultado direto da assimetria do Universo ou de suas consequências indiretas.

Louis Pasteur

Quem acredita sempre alcança!

Renato Russo

RESUMO

SIMÕES, R. A. **Avaliação de técnicas miniaturizadas de preparação de amostras na análise enantiosseletiva de fármacos quirais com diferentes características ácido-base em meio microssomal e aplicação em estudos de metabolismo *in vitro*.** 2012. 160 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Neste trabalho, a microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (HF-LPME), a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e a microextração em fase sólida na configuração de um filme delgado (SPME/TFME) foram empregadas como técnicas de microextração para a preparação de amostras microssomais no estudo de metabolismo *in vitro* de fármacos quirais com diferentes características ácido-base. Para análise empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector por absorção no UV e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS-MS). O fármaco neutro isradipina (ISR) foi o primeiro a ser abordado. Um método estereosseletivo empregando HF-LPME-HPLC foi desenvolvido para a determinação dos enantiômeros da ISR e seu principal metabólito (um derivado piridínico da isradipina - PDI) em fração microssomal isolada de fígado de ratos. Os analitos foram extraídos de 1 mL de meio microssomal utilizando o procedimento HF-LPME na configuração duas fases, tendo o solvente acetato de hexila como fase aceptora. Pela primeira vez, o PDI e os enantiômeros da ISR foram resolvidos numa mesma corrida cromatográfica. Para esta separação foi utilizada uma coluna Chiralpak AD® e hexano:2-propanol:etanol (94/04/02, v/v/v) como fase móvel, na vazão de 1,5 mL min^{-1}. A ISR e o PDI foram detectados em 325 nm e o padrão interno, oxibutinina, foi detectado em 225 nm. A validação do método mostrou valores de recuperação de 23% para o PDI e 19% para cada enantiômero da ISR, 50 ng mL^{-1} como limite de quantificação (LOQ) para todos os analitos e linearidade entre 50-5000 ng mL^{-1} e 50-2500 ng mL^{-1} para o PDI e cada enantiômero da ISR, respectivamente. O método desenvolvido e validado foi aplicado em um estudo de metabolismo *in vitro*, utilizando microssomas hepáticos de ratos, mostrando que o (+)-(S)-ISR foi preferencialmente metabolizado. Do mesmo modo que para a ISR, um método analítico empregando HF-LPME-HPLC no modo três-fases foi desenvolvido para a análise estereosseletiva concomitante do bufuralol (BF) e dos seus principais metabólitos 1'-oxobufuralol (1'-Oxo-BF) e 1'-hidroxibufuralol (1'-OH-BF) em preparações microssomais. As análises por HPLC foram conduzidas empregando uma coluna Chiralcel OD-H® com fase móvel composta por hexano:2-propanol:metanol:dietilamina (97,5/2,0/0,5/0,5, v/v/v/v), na vazão de 1,5 mL min^{-1} e detecção em 248 nm e 273 nm. As condições otimizadas da HF-LPME foram: n-octanol como solvente orgânico, ácido acético 0,2 mol L^{-1} como fase aceptora, fase doadora com pH ajustado em 13 e agitação de 1500 rpm por 30 min. O método foi validado e apresentou valores de recuperação entre 63 – 69% para os analitos e mostrou-se linear entre 100 – 5000 ng mL^{-1} para cada enantiômero do 1'-Oxo-BF e 100 – 2500 ng mL^{-1} para cada estereoisômero do 1'-OH-BF ($r > 0,99$), com LOQ de 100 ng mL^{-1} para todos os analitos. O método desenvolvido e validado foi aplicado em um estudo de metabolismo *in vitro* do BF utilizando microssomas hepáticos de ratos, que mostrou formação predominante do (S)-1'-Oxo-BF e do (R,R)-1'-OH-BF. Um segundo fármaco básico abordado neste trabalho foi a ranolazina (RNZ). Para a análise enantiosseletiva da RNZ e de um de seus metabólitos (desmetil ranolazina - DRNZ) em fração microssomal isolada de fígado de ratos, foi desenvolvido um método estereosseletivo empregando a DLLME-LC-MS-MS. Os analitos foram extraídos de 0,5 mL de meio microssomal utilizando o procedimento DLLME, tendo o clorofórmio como solvente extrator e acetona como solvente dispersante. Pela primeira vez os enantiômeros da RNZ e DRNZ foram resolvidos numa mesma corrida cromatográfica.

Para esta separação foi utilizada uma coluna Chiralcel OD-H® e hexano:etanol (60/40, v/v) e 0,05% de dietilamina como fase móvel, na vazão de 1,0 mL min^{-1}. A validação do método mostrou valores de recuperação em torno dos 55 e 45% para os enantiômeros da RNZ e DRNZ, respectivamente. Os LOQ foram de 25 ng mL^{-1} para cada enantiômero da RNZ e 10 ng mL^{-1} para cada enantiômero da DRNZ. A linearidade foi estabelecida entre 10-1000 ng mL^{-1} e 25-2500 ng mL^{-1} para cada enantiômero da DRNZ e RNZ, respectivamente. O método desenvolvido e validado foi aplicado em um estudo de metabolismo *in vitro* utilizando microssomas hepáticos de ratos, mostrando que a metabolismo da RNZ foi enantiosseletivo. Finalmente, um método analítico empregando a SPME/TFME-LC-MS-MS foi desenvolvido para a análise simultânea do fármaco anfótero repaglinida (RPG) e dois dos seus principais metabólitos, a 2-despiperiril-2-amino-repaglinida (DA-RPG) e a 2-despiperidil-2-(5-carboxipentilamina)-repaglinida (DC-RPG) em fração microssomal isolada de fígado humano. A SPME/TFME foi conduzida com o auxílio do equipamento *Multi Sampler SPME* nas seguintes condições: pré-condicionamento dos *blades* com 1 mL de uma solução metanol:água (50/50, v/v) por 30 min, 60 min de extração e 90 min de dessorção com 1 mL de fase móvel. A análise por LC-MS-MS foi feita empregando uma coluna cromatográfica C18 em modo reverso, com fase móvel composta por acetonitrila:água (50/50, v/v) e 0,1% de ácido acético, na vazão de 0,5 mL min^{-1}. A validação do método mostrou valores de recuperação acima dos 80% para todos os analitos. O LOQ foi de 2 ng mL^{-1} para todos os analitos, sendo o método linear no intervalo 2-1000 ng mL^{-1} para a RPG e 2-500 ng mL^{-1} para a DA-RPG e DC-RPG. Os analitos foram estáveis durante todo o protocolo analítico e de metabolismo. O método validado foi aplicado em um estudo de metabolismo *in vitro* utilizando microssomas hepáticos de humanos, mostrando que o perfil metabólico da RPG e a taxa de formação da DA-RPG e DC-RPG é alterada em função da concentração de proteínas microssomais no meio de incubação e também em função do tempo de incubação. Além disso, os resultados mostram a possibilidade de haver diversos outros metabólitos que não foram monitorados.

Palavras-chave: técnicas de microextração; análise enantiosseletiva; metabolismo *in vitro.*

ABSTRACT

SIMÕES, R. A. **Evaluation of microextraction techniques for sample preparation for the enantioselective analysis of chiral drugs with different acid-base characteristics in microsomal medium and application to *in vitro* metabolism studies.** 2012. 160 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

In the present work, the microextraction techniques hollow-fiber liquid phase microextraction (HF-LPME), dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and solid phase microextraction based on thin film (SPME/TFME) were used as sample preparation techniques to study the *in vitro* metabolism of chiral drugs with distinct acid-base characteristics. High-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS-MS) were used for the analyses. An enantioselective liquid chromatographic method using two-phase hollow- fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME-HPLC) was developed for the determination of isradipine (ISR) enantiomers and its main metabolite (pyridine derivative of isradipine - PDI) in microsomal fraction isolated from rat liver. The analytes were extracted from 1 mL of microsomal medium using a two-phase HF-LPME procedure with hexyl acetate as the acceptor phase, 30 min of extraction and sample agitation at 1500 rpm. For the first time, ISR enantiomers and PDI were resolved. For this separation, a Chiralpak AD® column with hexane:2-propanol:ethanol (94/04/02, v/v/v) as mobile phase at a flow rate of 1.5 mL min^{-1} were used. The column was kept at 23 °C ± 2. The drug and metabolite detection was performed at 325 nm and the internal standard oxybutynin was detected at 225 nm. The recovery rates were 23% for PDI and 19% for each ISR enantiomer. The method presented quantification limits (LOQ) of 50 ng mL^{-1} and it was linear over the concentration range of 50-5000 ng mL^{-1} and 50-2500 ng mL^{-1} for PDI and each ISR enantiomer, respectively. The validated method was employed to an *in vitro* metabolism study of ISR using rat liver microsomal fraction, showing that (+)-(S)-ISR is preferentially metabolized. In the same way, a three-phase HF-LPME-HPLC method for the stereoselective determination of bufuralol metabolites, 1'-oxobufuralol (1'-Oxo-BF) and 1'-hydroxybufuralol (1'-OH-BF), in microsomal preparations is described for the first time. The HPLC analysis was carried out using a Chiralcel OD-H® column with hexane:2-propanol:methanol (97.5/2.0/0.5, v/v/v) plus 0.5% diethylamine as the mobile phase, and UV detection at 248 and 273 nm. The HF-LPME optimized conditions involved: n-octanol as the organic solvent, 0.2 mol L^{-1} acetic acid as the acceptor phase, donor phase pH adjusted to 13, sample agitation at 1500 rpm and extraction for 30 min. By using this extraction procedure, the recovery rates were in the range of 63–69%. The method was linear over the concentration range of 100–5000 ng mL^{-1} for each enantiomer of 1'-Oxo-BF and of 100–2500 ng mL^{-1} for each stereoisomer of 1'-OH-BF. The quantification limits were 100 ng mL^{-1} for all analytes. The validated method was used to assess the *in vitro* metabolism of bufuralol using rat liver microsomal fraction that demonstrated predominant formation of (S)-1'-Oxo-BF and (R,R)-1'-OH-BF. A second basic drug addressed in this thesis is ranolazine (RNZ). For the chiral analysis of RNZ and one of its metabolites (desmethyl ranolazine - DRNZ) in microsomal fraction isolated from rat liver, an analytical enantioselective method using DLLME-LC-MS-MS was developed. The analytes were extracted from 0.5 mL of microsomal medium by DLLME. Chloroform was the extractor solvent and acetone the dispersive solvent. The enantiomers of RNZ and DRNZ were analyzed simultaneously for the first time using a Chiralcel OD-H® column and hexane:ethanol (60/40, v/v) plus 0.05% diethylamine as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL min^{-1}. Method validation showed recoveries in the order of 55 and 45% for the enantiomers

of RNZ and DRNZ, respectively. The LOQs were 25 ng mL^{-1} for each RNZ enantiomers and 10 ng mL^{-1} for each DRNZ enantiomers. Linearity was established between 10-1000 ng mL^{-1} and 25-2500 ng mL^{-1} for each DRNZ and RNZ enantiomers, respectively. The validated method was employed to an *in vitro* metabolism study of RNZ using rat liver microsomal fraction, showing that the metabolism of RNZ is enantioselective. Finally, an analytical method was developed employing SPME/TFME-LC-MS-MS for the simultaneous analyses of the anphoteric drug repaglinide (RPG) and two of the its main metabolites 2-despiperidyl-2-amino repaglinide (DA-RPG) and 2-despiperidyl-2-(5-carboxypentylamine) repaglinide (DC-RPG) in human microsomal fraction. The SPME/TFME procedure was carried out with the support of "Multi Sampler SPME" under the following conditions: conditioning of the blades with 1 mL of methanol:water (50/50, v/v) for 30 min, 60 min for extraction and 90 min for desorption with 1 mL of mobile phase. The LC-MS-MS analyses were performed using a C18 column under reversed phase conditions, with the mobile phase of acetonitrile:water (50/50, v/v) plus 0.1% acetic acid at a flow rate of 0.5 mL min^{-1}. The method validation showed recoveries over 80% for all analytes. The LOQ was 2 ng mL^{-1} for all analytes, and the method was linear over the concentration range of 2 e 1000 ng mL^{-1} for RPG and of 2 a 500 ng mL^{-1} for DA-RPG and DC-RPG. The validated method was used to assess the *in vitro* metabolism profile of RPG by using human liver microsomes. These studies showed that the rate of formation of DA-RPG and DC-RPG depends on both microsomal protein concentration in the incubation medium and the incubation time. Furthermore, the results highlighted the possibility of formation of several other metabolites which have not been monitored.

Keywords: microextraction techniques; enantioselective analysis; *in vitro* metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Sistema da HF-LPME empregado neste trabalho 04
Figura 1.2 - Ilustração da HF-LPME 05
Figura 1.3 - Fotografia de diferentes etapas da DLLME 06
Figura 1.4 - Principais variáveis que influenciam a eficiência da DLLME 08
Figura 1.5 - Equipamentos utilizados para extração por SPME de 96 amostras simultaneamente 11
Figura 1.6 - Parâmetros que interferem na extração por SPME/TFME 12
Figura 2.1 - Estruturas químicas da isradipina (1) e seu metabólito (2) 27
Figura 2.2 - Procedimento de isolamento dos microssomas hepáticos 35
Figura 2.3 - Cromatogramas referentes a resolução do PDI e enantiômeros da ISR e IS 38
Figura 2.4 - Seleção do solvente orgânico para extração da ISR e PDI 39
Figura 2.5 - Avaliação do tempo de extração da ISR e PDI 40
Figura 2.6 - Análise da influência da velocidade de agitação na extração da ISR e PDI 40
Figura 2.7 - Cromatogramas referentes à análise dos enantiômeros da ISR e do PDI após o procedimento de HF-LPME 46
Figura 2.8 - Concentração de proteínas microssomais no meio de incubação da ISR 47
Figura 2.9 - Tempo de incubação da ISR 47
Figura 2.10 - Gráfico de Michaelis-Menten para os enantiômeros da ISR 48
Figura 3.1 - Estrutura química do bufuralol (A), 1'-oxobufuralol (B) e 1'-hidroxibufuralol (C) 54
Figura 3.2 - Separação dos estereoisômeros do BF e de seus metabólitos na coluna Chiralcel OD-H 62
Figura 3.3 - Cromatogramas representativos dos analítos após o procedimento de HF-LPME 69
Figura 3.4 - Variação da concentração de proteínas microssomais no meio de incubação do BF 70
Figura 3.5 – Variação do tempo de incubação do BF 71
Figura 3.6 - Influência da concentração do BF na formação dos metabólitos 72
Figura 4.1 - Estruturas químicas da ranolazina e desmetil ranolazina 76
Figura 4.2 - Cromatogramas referentes a resolução dos enantiômeros da RNZ e DRNZ 85
Figura 4.3 - Avaliação do solvente extrator e dispersante na extração da RNZ e DRNZ 87

Figura 4.4 - Avaliação do volume dos solventes extrator e dispersante na eficiência da extração da RNZ e DRNZ 89
Figura 4.5 - Avaliação do volume da amostra na eficiência da extração da RNZ e DRNZ.. 90
Figura 4.6 - Avaliação da influência do pH da amostra na eficiência da extração da RNZ e DRNZ 91
Figura 4.7 - Avaliação da influência do banho ultrassônico na eficiência da extração da RNZ e DRNZ 92
Figura 4.8 - A) Influência da concentração de proteínas microssomais na metabolização da RNZ 98
Figura 4.8 - B) Correlação entre as concentrações dos dois enantiômeros da RNZ 98
Figura 4.9 - A) Influência do tempo de incubação na metabolização da RNZ 99
Figura 4.9 - B) Correlação entre as concentrações dos dois enantiômeros da RNZ 99
Figura 5.1 - Estrutura química da repaglinida e seus principais metabólitos 106
Figura 5.2 - Fluxograma para o estudo de metabolismo *in vitro* da RPG empregando microssomas humanos 114
Figura 5.3 - Cromatogramas representativos da análise dos analitos da DA-RPG, RPG, DC-RPG e do padrão interno RPG-d5 115
Figura 5.4 - Avaliação das fases extratoras e soluções de dessorção na extração da RPG, DA-RPG e DC-RPG 117
Figura 5.5 - Avaliação do tempo de dessorção da RPG, DA-RPG e DC-RPG 118
Figura 5.6 - Comparação entre os níveis de recuperação RPG, DA-RPG e DC-RPG após 60 e 90 min de dessorção 119
Figura 5.7 - Comparação entre os níveis de *carry over* da RPG, DA-RPG e DC-RPG após 60 e 90 min de dessorção 119
Figura 5.8 - Efeito do pH na eficiência da extração da RPG, DA-RPG e DC-RPG 121
Figura 5.9 - Perfil da extração da RPG, DA-RPG e DC-RPG na matriz livre dos microssomas e no meio microssomal 122
Figura 5.10 - Fluxograma de execução da extração da RPG, DA-RPG e DC-RPG empregando o *SPME Multi-Sampler* 123
Figura 5.11 - Cromatogramas representativo do extrato de amostras “brancas” 128
Figura 5.12 - Avaliação do metabolismo da RPG em função do tempo 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Principais seletores baseados em polissacarídeos disponíveis comercialmente 14
Tabela 2.1- Colunas cromatográficas avaliadas para análise da RPG e PDI 31
Tabela 2.2 - Linearidade do método de análise da ISR e PDI 42
Tabela 2.3 - Limites de quantificação do método de análise da ISR e PDI 43
Tabela 2.4 - Precisão e exatidão do método de análise da ISR e PDI 43
Tabela 2.5 - Recuperação do método de análise da ISR e PDI 44
Tabela 2.6 - Estabilidade do método de análise da ISR e PDI 45
Tabela 3.1 - Parâmetros da validação do método de análise dos enantiômeros do 1'-Oxo-BF e estereoisômeros do 1'-OH-BF 59
Tabela 3.2 - Parâmetros de desempenho cromatográfico nas condições otimizadas para análise dos estereoisômeros do BF, 1’-Oxo-BF e 1’-OH-BF 62
Tabela 3.3 - Composição do meio fermentativo Czapek 63
Tabela 3.4 - Recuperação e linearidade do método de análise dos estereoisômeros do BF, 1’-Oxo-BF e 1’-OH-BF 64
Tabela 3.5 - Limite de quantificação do método de análise dos estereoisômeros do 1’-Oxo-BF e 1’-OH-BF 65
Tabela 3.6 - Precisão e exatidão intradia da análise dos estereoisômeros do 1’-Oxo-BF e 1’-OH-BF 66
Tabela 3.7 - Precisão e exatidão interdia da análise dos estereoisômeros do 1’-Oxo-BF e 1’-OH-BF 67
Tabela 3.8 - Estabilidade dos estereoisômeros do 1’-Oxo-BF e 1’-OH-BF à temperatura ambiente e de incubação 68
Tabela 4.1 - Parâmetros da validação do método da RNZ e DRNZ 81
Tabela 4.2 - Linearidade do método de análise da RNZ e DRNZ 93
Tabela 4.3 - Limite de quantificação do método de análise da RNZ e DRNZ 94
Tabela 4.4 - Recuperação do método de análise da RNZ e DRNZ 95
Tabela 4.5 - Precisão e exatidão do método de análise da RNZ e DRNZ 96
Tabela 4.6 - Estabilidade do método de análise dos enantiômeros da RNZ e DRNZ 97
Tabela 4.7 - Efeito da matriz sobre a ionização dos enantiômeros da RNZ e DRNZ 97

Tabela 5.1 - Parâmetros do espectrômetro de massas para a RPG, DA-RPG, DC-RPG e RPGd5 110
Tabela 5.2 - Parâmetros avaliados na otimização da SPME/TFME para análise da RPG, DA-RPG e DC-RPG em meio microssomal 112
Tabela 5.3 - Parâmetros da validação do método de análise da RPG, DA-RPG e DC-RPG 113
Tabela 5.4 - Solventes de dessorção utilizados na tentativa de aumentar a eficiência da dessorção da RPG, DA-RPG e DC-RPG 120
Tabela 5.5 - Condições finais para a extração da RPG, DA-RPG e DC-RPG 123
Tabela 5.6 - Linearidade do método de análise da RPG, DA-RPG e DC-RPG 124
Tabela 5.7 - Limites de quantificação do método de análise da RPG, DA-RPG e DC-RPG 124
Tabela 5.8 - Recuperação do método de análise da RPG, DA-RPG e DC-RPG..... 125
Tabela 5.9 - Precisão e exatidão do método de análise da RPG, DA-RPG e DC-RPG 126
Tabela 5.10 - Avaliação da estabilidade da RPG, DA-RPG e DC-RPG durante o processo analítico 127
Tabela 5.11 - Efeito da matriz na ionização da RPG, DA-RPG e DC-RPG 128

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATUTRAS

1’-OH-BF	1’-hidroxibufuralol
1’-Oxo-BF	1’-oxobufuralol
ACN	acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BF	Bufuralol
C18	grupo octadecil
C18-PAN	Octadecil-sílica e poliacrilonitrila
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CSP	fase estacionária quiral *(Chiral Stationary Phase)*
CV	coeficiente de variação
CYP 450	citocromo P450
DA-RPG	2-despiperidil-2-amino repaglinida
DC-RPG	2-despiperidil-2-(5-carboxipentilamina) repaglinida
DLLME	microextração líquido-líquido dispersiva *(Dispersive Líquid-Liquid Extraction)*
DRNZ	desmetil ranolazina
E	erro relativo
FDA	*Food and Drug Administration*
HF-LPME	microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca *(Hollow-Fiber Liquid Phase Microextraction)*
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography*)
ISR	isradipina
k	fator de retenção
LC-DIOL-PAN	sílica diol e poliacrilonitrila
LC-MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)*
LLE	extração líquido-líquido *(Liquid-Líquid Extraction)*
LOQ	limite de quantificação

LPME	microextração em fase líquida *(Liquid Phase Microextraction)*
m/z	razão massa carga
Mixmode-PAN	Octadecil-sílica, ácido benzenosulfônico e poliacrilonitrila
MS	detector por espectrometria de massas
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato *(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)*
PBA-PAN	ácido fenilborônico e poliacrilonitrila
PDI	metabólito da isradipina
PP	precipitação de proteínas *(Protein Precipitation)*
PS-DVB-PAN	benzeno divinil-poliestireno com um fraco trocador iônico e poliacrilonitrila
r	coeficiente de correlação
rac	Racêmico
RNZ	ranolazina
RPG	repaglinida
SPE	extração em fase sólida *(Solid Phase Extraction)*
SPME	microextração em fase sólida *(Solid Phase Microextraction)*
TFME	microextração com filme delgado *(Thin Film Microxtraction)*
UV	Detecção por absorção ultravioleta
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT iii
LISTA DE FIGURAS v
LISTA DE TABELAS vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS ix

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO GERAL 1
1.1 TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS 3
1.1.1 Microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (HF-LPME) 3
1.1.2 Microextração líquido – líquido dispersiva (DLLME) 5
1.1.3 Microextração em fase sólida (SPME) 9
1.2 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DE FÁRMACOS QUIRAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA 13
1.3 METABOLISMO *IN VITRO* DE FÁRMACOS 16
1.4 OBJETIVOS GERAIS DO PROJETO 19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 20

Capítulo 2 - Análise enantiosseletiva da isradipina e do seu principal metabólito em meio microssomal empregando HF-LPME-HPLC 26
2.1 ISRADIPINA 26
2.2 OBJETIVOS 29
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS 30
2.3.1 Soluções-padrão 30
2.3.2 Análise cromatográfica - Instrumentação e condições analíticas 30
2.3.3 Microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (HF-LPME) 31
2.3.3.1 Equipamentos, reagentes e solventes 31
2.3.3.2 Otimização do procedimento da HF-LPME 32
2.3.4 Validação do método cromatográfico 33
2.3.4.1 Soluções-padrão 33
2.3.4.2 Curva analítica e linearidade 33
2.3.4.3 Limite de quantificação 33

2.3.4.4 Recuperação 33
2.3.4.5 Precisão e exatidão 34
2.3.4.6 Estabilidade 34
2.3.4.7 Seletividade 34
2.3.5 Estudo de metabolismo *in vitro* 34
2.3.5.1 Equipamentos, reagentes e solventes 34
2.3.5.2 Animais 35
2.3.5.3 Procedimento de obtenção da fração microssomal do fígado de ratos 35
2.3.5.4 Estudo de metabolismo in vitro da ISR 36
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 37
2.4.1 Separação dos enantiômeros da isradipina e do seu principal metabólito empregando fases estacionárias quirais 37
2.4.1.1 Modo polar orgânico 37
2.4.1.2 Modo normal 37
2.4.1.3 Condições cromatográficas otimizadas 38
2.4.1.4 Ordem de eluição 38
2.4.2 Otimização do procedimento de microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca 39
2.4.2.1 Membrana cilíndrica oca 39
2.4.2.2 Solvente orgânico 39
2.4.2.3 Tempo de extração 40
2.4.2.4 Velocidade de agitação 41
2.4.2.5 Salting-out 41
2.4.2.6 Parâmetros otimizados 41
2.4.3 Validação do método 42
2.4.3.1 Linearidade e limite de quantificação 42
2.4.3.2 Precisão e exatidão 43
2.4.3.3 Recuperação 43
2.4.3.4 Estabilidade 45
2.4.3.5 Seletividade 45
2.4.4 Estudo de metabolismo *in vitro* da isradipina 46
2.4.4.1 Otimização das condições de incubação 46
2.4.4.1.1 Concentração de proteínas 46

2.4.4.1.2 Tempo de incubação 47
2.4.4.1.3 Concentração do substrato 48
2.5 COMENTÁRIOS FINAIS 49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 50

Capítulo 3 - Análise estereosseletiva do bufuralol, 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol em meio microssomal empregando HF-LPME-HPLC 53
3.1 BUFURALOL 53
3.2 OBJETIVOS 55
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS 56
3.3.1 Soluções-padrão 56
3.3.2 Análise cromatográfica - Instrumentação e condições analíticas 56
3.3.3 Microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca 57
3.3.3.1 Equipamentos, reagentes e solventes 57
3.3.3.2 Procedimento de preparação das amostras 57
3.3.4 Validação do método cromatográfico 58
3.3.4.1 Soluções-padrão 58
3.3.4.2 Curva analítica e linearidade, limite de quantificação, recuperação, precisão, exatidão, estabilidade e seletividade 58
3.3.5 Estudo de biotransformação 59
3.3.5.1 Equipamentos, reagentes e solventes 59
3.3.5.2 Animais 59
3.3.5.3 Procedimento de obtenção da fração microssomal do fígado de ratos 59
3.3.5.4 Estudo da biotransformação in vitro 59
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 61
3.4.1 Separação dos estereoisômeros do BF, 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF 61
3.4.1 Ordem de eluição 63
3.4.2 Otimização do procedimento da HF-LPME 63
3.4.3 Validação do método 64
3.4.3.1 Recuperação e linearidade 64
3.4.3.2 Limite de quantificação 65
3.4.3.3 Precisão e exatidão 66
3.4.3.4 Estabilidade 68

3.4.3.5 Seletividade 69
3.4.4 Estudo do metabolismo *in vitro* do bufuralol 69
3.4.4.1 Otimização da condições de incubação 69
3.4.4.1.1 Concentração de proteínas 70
3.4.4.1.2 Tempo de incubação 70
3.4.4.1.3 Concentração do substrato 71
COMENTÁRIOS FINAIS 73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 74

Capítulo 4 - Análise enantiosseletiva da ranolazina e desmetil ranolazina em meio microssomal utilizando DLLME-LC-MS-MS 76
4.1 RANOLAZINA 76
4.2 OBJETIVOS 78
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS 79
4.3.1 Soluções-padrão 79
4.3.2 Análise cromatográfica - Instrumentação e condições analíticas 79
4.3.3 Microextração líquido-líquido dispersiva 80
4.3.3.1 Reagentes e solventes 80
4.3.3.2 Composição média da matriz microssomal 80
4.3.3.3 Procedimento geral da otimização da extração por DLLME 80
4.3.4 Validação do método cromatográfico 81
4.3.4.1 Soluções-padrão 81
4.3.4.2 Curva analítica e linearidade, limite de quantificação, recuperação, precisão, exatidão, estabilidade e seletividade 81
4.3.4.3 Efeito da matriz na ionização dos analitos 82
4.3.5 Estudo de metabolismo *in vitro* 82
4.3.5.1 Equipamentos, reagentes e solventes 82
4.3.5.2 Animais 83
4.3.5.3 Procedimento de obtenção da fração microssomal do fígado de ratos 83
4.3.5.4 Estudo do metabolismo in vitro da Ranolazina 83
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 84
4.4.1 Separação dos enantiômeros da RNZ e DRNZ empregando fases estacionárias quirais 84

4.4.2 Otimização do procedimento de DLLME 85
4.4.2.1 Solvente extrator e dispersante 86
4.4.2.2 Avaliação do volume do solvente extrator e dispersante 87
4.4.2.3 Volume da amostra 89
4.4.2.4 pH da amostra 90
4.4.2.5 Banho ultrassônico 91
4.4.2.6 Tempo de extração e centrifugação 92
4.4.2.7 Parâmetros otimizados 93
4.4.3 Validação do método 93
4.4.3.1 Linearidade e limite de quantificação 93
4.4.3.2 Recuperação 94
4.4.3.3 Precisão e exatidão 96
4.4.3.4 Estabilidade 96
4.4.3.5 Efeito da matriz na ionização dos analitos 97
4.4.4 Estudo do metabolismo *in vitro* da ranolazina 98
4.4.4.1 Concentração de proteínas 98
4.4.4.2 Tempo de incubação 99
4.5 COMENTÁRIOS FINAIS 100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 101

Capítulo 5 - Desenvolvimento de um método analítico para o estudo do metabolismo *in vitro* da repaglinida empregando *Multiblade* SPME/TFME-LC-MS-MS 104
5.1 REPAGLINIDA 104
5.2 OBJETIVOS 108
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS 109
5.3.1 Soluções-padrão 109
5.3.2 Análise cromatográfica - Instrumentação e condições analíticas 109
5.3.3 Microextração em fase sólida empregando o sistema *multiblade* 110
5.3.3.1 Equipamentos e materiais 110
5.3.3.2 Reagentes e solventes 110
5.3.3.3 Composição da matriz 110
5.3.3.4 Otimização do procedimento da extração por SPME/THFME 111

5.3.4 Validação do método 112
5.3.5 Estudo de metabolismo *in vitro* da RPG 114
5.3.5.1 Equipamentos, reagentes e solventes 114
5.3.5.2 Perfil metabólico in vitro da RPG 114
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 115
5.4.1 LC-MS-MS 115
5.4.2 Otimização do procedimento da microextração em fase sólida 116
5.4.2.1 Fase extratora e solvente de dessorção 116
5.4.2.2 Tempo de dessorção e carry over 118
5.4.2.3 pH da amostra 120
5.4.2.4 Tempo de extração 121
5.4.2.5 Condições otimizadas 123
5.4.3 Validação do método desenvolvido 124
5.4.3.1 Linearidade e limite de quantificação 124
5.4.3.2 Recuperação 124
5.4.3.3 Precisão e exatidão 126
5.4.3.4 Estabilidade 126
5.4.3.5 Seletividade e efeito de matriz na ionização dos analitos 127
5.4.4 Estudo do metabolismo *in vitro* da repaglinida 129
5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 132

Capítulo 6 – CONCLUSÕES FINAIS 134
6.1 CONCLUSÕES GERAIS 134

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL

A importância da análise estereosseletiva na área farmacêutica é sempre muito destacada, pois diversos fármacos quirais são comercializados como misturas racêmicas, embora seus enantiômeros apresentem propriedades farmacodinâmicas e/ou farmacocinéticas estereosseletivas, requerendo métodos de análise estereosseletivos que permitam diferenciá-los. A análise estereosseletiva empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High-performance Liquid Chromatography*) é prática e eficaz na determinação de enantiômeros ao nível de traços em matrizes complexas, por exemplo, em estudos de disposição cinética. Mas, para a utilização dessa técnica no desenvolvimento de métodos bioanalíticos é necessário um passo pré-analítico: a preparação das amostras.

A precipitação de proteínas (PP), a extração líquido-líquido (LLE, *Liquid-Líquid Extraction*) e a extração em fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) são técnicas clássicas de preparo de amostras biológicas. Entretanto, essas técnicas têm características intrínsecas que desfavorecem o seu emprego. Por exemplo, a LLE e SPE além de consumirem grande quantidade de solventes orgânicos, em muitos casos, demandam boa parte do tempo total requerido para a análise. Com relação à PP, esta é uma técnica relativamente rápida, entretanto com baixo potencial de *clean up*, levando a problemas cromatográficos (por exemplo, contaminação da coluna cromatográfica) ou de detecção (por exemplo, efeito da matriz na ionização dos analitos quando se utiliza a espectrometria de massas como técnica de detecção). A PP também não é recomendada quando o analito está presente em quantidades reduzidas na amostra, pois ela não possibilita a sua concentração (PAWLISZYN; LORD, 2010; VUCKOVIC et al., 2008). Para superar as desvantagens das técnicas de extração tradicionais, uma importante linha de pesquisa está direcionada para a miniaturização dessas técnicas. Pesquisas voltadas à miniaturização de técnicas extrativas foram iniciadas pelo Prof. Dr. Janusz Pawliszyn (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990) em 1990, com a introdução da microextração em fase sólida (SPME, *Solid Phase Microextraction*). Posteriormente, foi introduzida a microextração em fase líquida (LPME, *Liquid Phase Microextraction*) (JEANNOT; CANTWEEL, 1996) e, mais recentemente, a microextração líquido-líquido

dispersiva (DLLME, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) (REZAEE et al., 2006).

Nesse trabalho, propusemos a utilização da SPME, HF-LPME e DDLME como técnicas de preparação de amostras biológicas, visando o desenvolvimento de métodos estereosseletivos com detectabilidade e seletividade adequadas para aplicações em estudos de metabolismo *in vitro* de fármacos quirais: isradipina, bufuralol, ranolazina e repaglinida. Os critérios utilizados para a escolha dos fármacos foram: variedade do comportamento químico, pois a isradipina é neutra, o bufuralol e a ranolazina são básicos e a repaglinida tem comportamento anfótero; escassez de bons métodos bioanalíticos enantiosseletivos desenvolvidos e validados; e inexistência de estudos de metabolismo estereosseletivos *in vitro* empregando microssomas. Nesse contexto, os dados gerados serão uma contribuição relevante para o melhor entendimento do papel da estereosseletividade nas propriedades desses fármacos.

O modelo escolhido para os estudos de metabolismo *in vitro* é baseado no uso de microssomas hepáticos de ratos e humanos pois: a) é um modelo bem caracterizado em estudos de metabolismo, de aplicabilidade relativamente simples e por ter baixo custo (microssomas de ratos); b) os microssomas de fígado humano oferecem o modo mais conveniente para estudar o metabolismo mediado pelo citocromo P450, mas isoformas do CYP450 de origem animal também permitem estudos comparativos a fim de extrapolar resultados de animais para humanos (ASHA; VIDYAVATHI, 2010; EKINS, et al., 2000).

Esta Tese de Doutorado foi dividida em 5 capítulos. Neste capítulo (Capítulo 1) serão abordados os aspectos gerais das técnicas empregadas neste trabalho: técnicas de microextração (HF-LPME, DDLME e SPME), análise enantiosseletiva de fármacos quirais por cromatografia líquida de alta eficiência e metabolismo *in vitro* de fármacos. Nos capítulos sequentes serão apresentados os dados do desenvolvimento, validação e aplicação dos métodos bioanalíticos desenvolvidos para: isradipina (Capítulo 2), bufuralol (Capítulo 3), ranolazina (Capítulo 4) e repaglinida (Capítulo 5). As considerações finais serão abordadas no Capítulo 6.

1.1. TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

1.1.1. Microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (HF-LPME)

A microextração em fase líquida (LPME, *Liquid Phase Microextraction*) foi introduzida em 1996 e consiste na utilização de uma gota de um solvente orgânico suspensa na ponta da agulha de uma microsseringa; a gota é mergulhada na amostra aquosa e os analitos presentes nessa amostra são extraídos para a gota que, subsequentemente é aspirada para dentro da seringa e o extrato é assim analisado (JEANNOT; CANTWEEL, 1996). No entanto, a LPME executada dessa forma não é muito robusta já que as gotas podem ser perdidas durante o processo de extração, principalmente quando aplica-se agitação da amostra para diminuir o tempo de extração (KRAMER; ANDREWS, 2001). Além disso, as amostras biológicas como o plasma podem emulsificar quantidades relevantes de solventes orgânicos, afetando a estabilidade da gota durante o processo de extração (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

Uma alternativa para a utilização da LPME foi proposta por Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (1999). A modificação da técnica consiste na utilização de uma membrana capilar cilíndrica e hidrofóbica (HF-LPME, *Hollow-Fiber Liquid Phase Microextraction*). O solvente orgânico é impregnado nos poros da membrana e o seu lúmen é preenchido com microlitros da fase aceptora (micro extrato). Com essa configuração, o microextrato não entra em contato direto com a amostra, permitindo que o sistema seja agitado sem que haja perda ou mistura da fase aceptora com a amostra. Além disso, o baixo custo de cada membrana (unidade de extração) torna possível utilizá-la apenas uma única vez, evitando-se problemas de *carry-over*, observado nas demais técnicas de extração com membranas.

A técnica pode ser executada com as duas extremidades da membrana porosa ligadas a duas microsseringas (sistema "U"); o volume da amostra geralmente varia de 0,1 a 4 mL e o comprimento da membrana de 1,5 a 10 cm. Devido às dificuldades no manuseio das duas microsseringas, foram desenvolvidos sistemas utilizando uma microsseringa com a membrana fechada em uma das extremidades (ZHU; LEE, 2001). Outro sistema emprega duas ponteiras para fixar as duas extremidades da membrana e possibilitar a introdução e retirada da fase aceptora (MAGALHÃES; BONATO, 2009). Esse sistema tem a vantagem adicional de permitir a extração de até 36 amostras simultaneamente, usando um agitador de tubos apropriado (Figura 1.1).

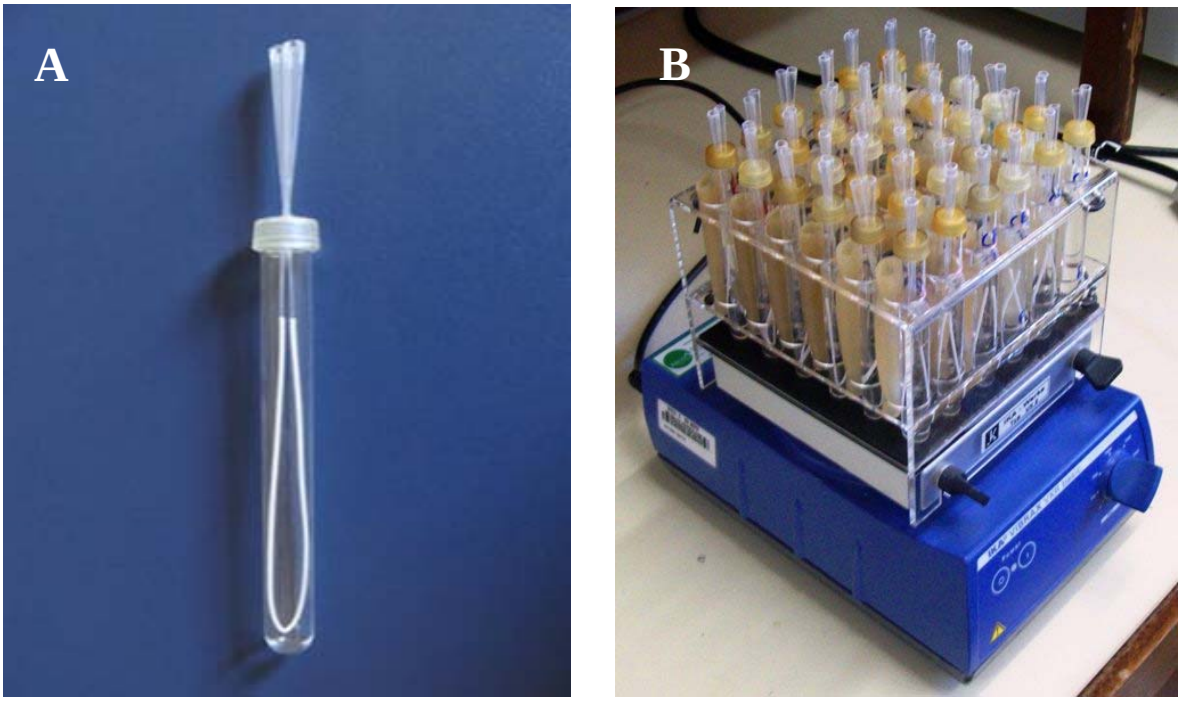


Figura 1.1 - Sistema da HF-LPME empregado neste trabalho. A) Unidade extratora da HF-LPME, composta por um seguimento de membrana cilíndrica oca fixada com suas extrimades fixadas à duas ponteiras plásticas e ajustada a um tubo de vidro (Adaptado de Magalhães e Bonato, (2009)). B) Equipamento (Vibrax VXR) utilizado para a agitação de 36 unidades da HF-LPME simultaneamente.

Durante a extração, os analitos são transferidos da amostra aquosa para a fase orgânica presente nos poros da membrana e desse local para a solução aceptora presente no seu interior (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Dependendo das características da fase aceptora, o sistema pode ser constituído por duas ou três fases (Figura 1.2). No sistema em duas fases, a solução aceptora é o próprio solvente orgânico utilizado na impregnação dos poros da membrana. No sistema em três fases, a solução aceptora é uma solução aquosa com pH oposto ao da solução doadora. Assim, após o analito deixar a solução doadora na sua forma neutra e passar pelo solvente orgânico presente nos poros da membrana, ele é ionizado na solução aceptora e impedido de voltar novamente para a solução doadora. Terminada a extração, a solução aceptora é retirada da membrana empregando uma microsseringa (MAGALHÃES; BONATO, 2008).

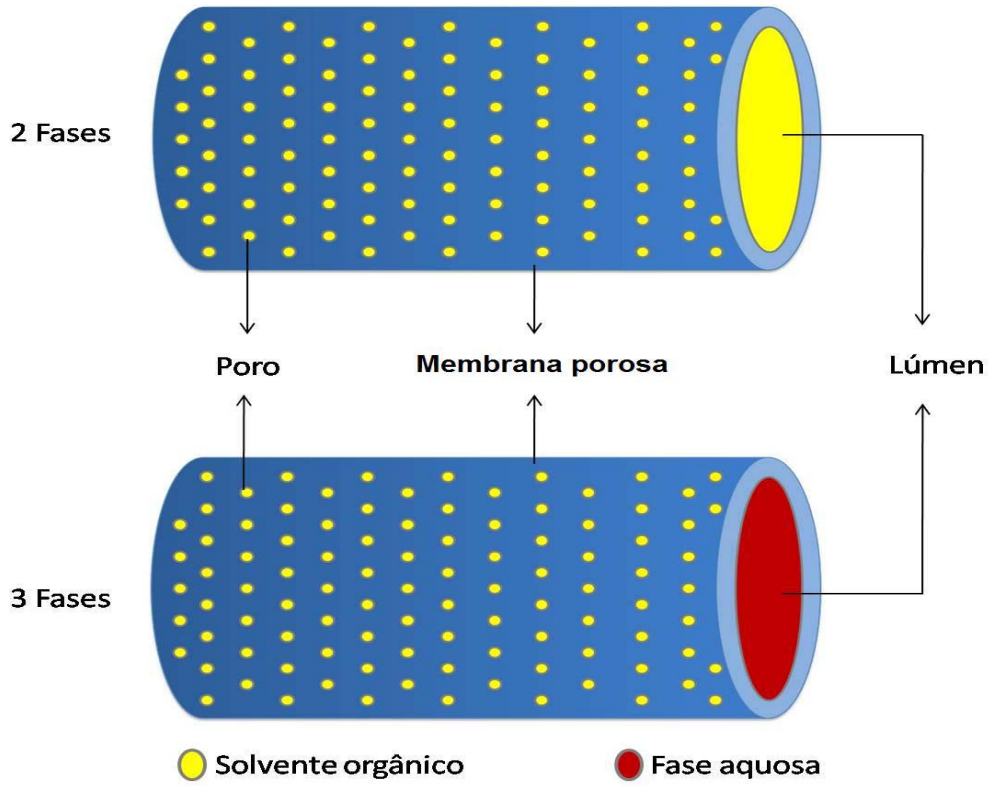


Figura 1.2 - Ilustração da HF-LPME.

Diferentes parâmetros devem ser otimizados durante o desenvolvimento do método HF-LPME, tais como: ajuste do pH e força iônica da amostra, membrana de extração, volume de amostra (solução doadora), tipo de solvente orgânico, tempo de extração, solução aceptora e agitação do sistema (PSILLANKIS; KALOGERAKIS, 2003; MAGALHÃES; DE OLIVEIRA; BONATO, 2009).

1.1.2. Microextração líquido – líquido dispersiva (DLLME)

A DLLME tem se mostrado uma técnica bastante atrativa para o preparo de amostras, pois é extremamente rápida, de fácil operação e caracterizada por elevados fatores de enriquecimento. A DLLME é uma técnica relativamente nova e foi introduzida em 2006 por Rezaee et al. (2006). Nesta técnica, uma mistura apropriada de um solvente extrator (SE) e um solvente dispersante (SD) é injetada bruscamente na amostra aquosa com o auxílio de uma seringa. O resultado é a formação da *cloudy solution*, que favorece o contato entre as fases. Em seguida, a amostra é centrifugada e o analito é recuperado dissolvido no SE, que pode então ser analisado (REZAEE et al., 2006).

A DLLME é uma técnica bastante simples e pode ser realizada em praticamente duas etapas (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010). A primeira delas é a injeção da solução de extração na amostra. A solução de extração consiste de uma mistura de quantidades adequadas do SE (por exemplo, solventes orgânicos mais densos que a água como clorobenzeno, clorofórmio e tetracloreto de carbono) e SD, o qual deve ser miscível tanto com o SE quanto com a amostra aquosa (por exemplo, metanol, etanol, acetonitrila e acetona). Quando a solução de extração é rapidamente adicionada à amostra aquosa onde encontram-se os analitos, uma alta turbulência é produzida (Figura 1.3. B). Devido a essa alta turbulência, ocorre a formação de um grande número de microgota do SE dispersas na amostra, que assume uma aparência turva (*cloudy solution*) (Figura 1.3. C). O sistema de microgota formado proporciona uma grande área de superfície de contato do SE com a amostra (Figura 1.3. D). Portanto, o estado de equilíbrio de distribuição das moléculas dos analitos entre a fase extratora e a amostra é alcançado rapidamente e, portanto, a extração é realizada num tempo muito curto, sendo essa é a maior vantagem do emprego da DLLME.

A segunda etapa corresponde à centrifugação da *cloudy solution*. Por serem mais densas do que a fase aquosa, as microgota do solvente extrator formam uma fase sedimentada líquida no fundo do tubo cônico. Esta fase sedimentada pode ser retirada com o auxílio de uma seringa para cromatografia gasosa ou HPLC e ser injetada diretamente no sistema cromatográfico, caso haja compatibilidade entre o solvente extrator e o sistema cromatográfico. Caso contrário, o SE é evaporado e o resíduo pode ser dissolvido em um solvente apropriado.

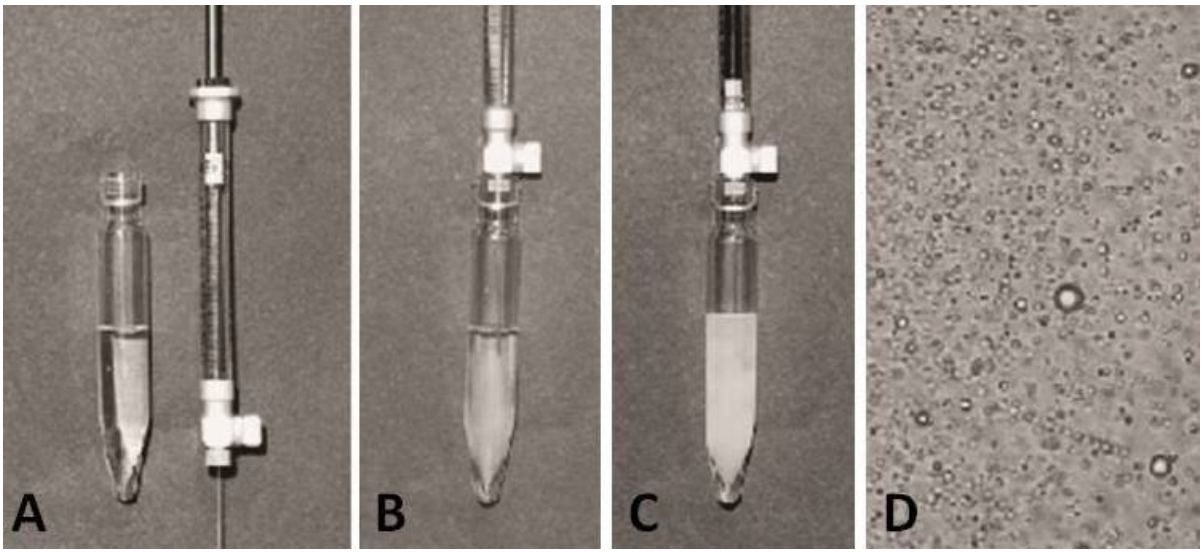


Figura 1.3 - Fotografia de diferentes etapas da DLLME. A) antes da injeção da mistura do solvente extrator e dispersante na amostra; B) início da injeção; C) fim da injeção; D) microscopia óptica (100x). Adaptado de (REZAEE et al., 2006).

Os principais fatores que interferem na eficiência da DLLME, e por isso precisam ser otimizados, são:

- *SE e SD.* A seleção do SE é um parâmetro fundamental na DLLME. Os solventes orgânicos a serem empregados devem ser insolúveis em água e mais densos do que esta; devem também ter alta capacidade de solubilizar os analitos de interesse e, se possível, ser compatível com o sistema cromatográfico a ser empregado. Os solventes halogenados como clorobenzeno, clorofórmio, tetracloroetileno, tetracloreto de carbono, entre outros, são extensivamente empregados, principalmente devido as suas altas densidades. Com relação aos SD, a principal característica requerida é a solubilidade tanto no SE quanto na amostra aquosa. Os solventes mais empregados como dispersantes são: metanol, etanol, acetona e acetonitrila (SUNA; SHIA; CHENA, 2011; CAMPILLO et al., 2010; FARAJZADEH; BAHRAM; JÖNSSON, 2007; WEI; LI; WANG, 2007; FARAJZADEH; VARDAST; BAHRAM, 2009; FARHADI; MATIN; HASHEMI, 2009; WU et al., 2009; ZHOU; PANG; XIAO, 2009; CHEN et al., 2009; CHEN et al., 2008).
- *Volume do SE, do SD e da amostra.* Para que haja uma extração eficiente por DLLME, é importante a formação da *cloudy solution* e de um volume adequado da fase sedimentada após a centrifugação. O volume do SD afeta diretamente a formação da *cloudy solution*, pois interfere no grau de dispersão do SE na fase aquosa e, consequentemente, na eficiência da extração. O volume necessário do SD para adequada formação da *cloudy solution* depende do volume da fase aquosa, bem como do volume do SE. Variações no volume do SD modificam também o volume da fase sedimentada. Em DLLME, os fatores que interferem de maneira preponderante no volume da fase sedimentada são: solubilidade do SE em água, volume da amostra, volume do SD e volume do SE (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010). A Figura 1.4 mostra a intricada relação entre as características dos componentes da DLLME e sua eficiência.

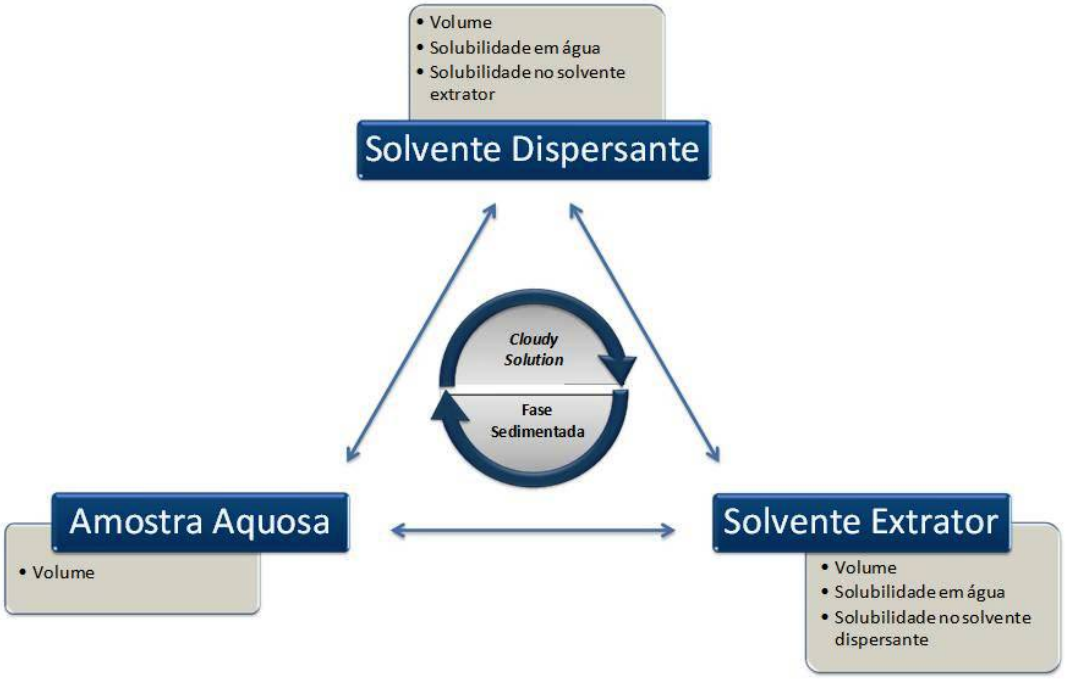


Figura 1.4 - Principais variáveis que influenciam a eficiência da DLLME.

Outros parâmetros, comuns à LLE convencional, também podem ser avaliados, como pH da amostra (quando se trata de extração de compostos iônicos ou ionizáveis) e adição de sais (efeito *salting out*).

Em DLLME, o tempo de extração é definido como o intervalo entre a adição da solução de extração à amostra e a centrifugação. Como a superfície de contato entre o SE e a amostra aquosa é extremamente grande, a transferência de massa do analito da fase aquosa para a fase extratora é muito rápida. Portanto, o tempo não é um parâmetro importante na eficiência da DLLME (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010).

A DLLME é amplamente utilizada para análise de vários compostos em água (matriz simples), entretanto, pouco empregada para a análise de compostos em amostras biológicas (matriz complexa). Apesar das várias vantagens, a DLLME tem sérias limitações quando se trata da extração de analitos de matrizes biológicas. Isto se deve, principalmente, à interação de componentes da matriz nestes tipos de amostras com solventes orgânicos, não sendo possível muitas vezes a obtenção de uma fase sedimentada "limpa" o suficiente para ser analisada nos sistemas cromatográficos. Para obter uma adequada fase sedimentada, alguns procedimentos anteriores a DLLME necessitam ser feitos, como filtração e/ou diluição das amostras (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010).

Apesar dessa limitação, a DLLME pode ser útil na análise de matrizes biológicas menos complexas como os meios de incubação utilizados em estudos de metabolismo *in vitro*.

O meio microssomal utizado nesses estudos, apesar de ser uma matriz biológica complexa, aapresenta baixa quantidade de proteínas (em comparação com o plasma), o que pode tornar a DLLME uma ferramenta muito útil.

1.1.3. Microextração em fase sólida (SPME)

A SPME é uma técnica de extração não exaustiva baseada no equilíbrio da fração livre dos analitos entre a amostra e uma fase extratora (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990). Historicamente, a SPME foi utilizada juntamente com a cromatografia gasosa (SPME-GC) para análise de substâncias em diferentes matrizes (ar, alimento, ambiental, biológica). Na última década, o emprego da SPME em conjunto com HPLC para análise de compostos não voláteis também ganhou espaço (VUCKOVIC et al., 2010).

Classicamente a extração por SPME tem sido feita de duas formas básicas: extração direta e *headspace*. Na extração direta, a fibra com a fase extratora é diretamente mergulhada na amostra. Durante a extração, a amostra é agitada com velocidade e tempos controlados. Após a extração os analitos podem ser dessorvidos da fase extratora termicamente (injetor aquecido de um equipamento para cromatografia gasosa) ou numa solução para em seguida serem analisados por HPLC, por exemplo. Já no *headspace,* a fibra não entra em contato diretamente com a amostra onde se encontram os analitos de interesse. Neste caso, a fase extratora extrai os analitos voláteis que migram da amostra para o espaço entre o líquido e as paredes do recipiente onde está sendo feita a extração. Portanto, os analitos têm que ser voláteis para poderem ser extraídos utilizando esta técnica. Além da agitação por um tempo determinado, também é comum o aquecimento das amostras para facilitar a volatilização dos analitos (DE OLIVEIRA; BONATO, 2007).

Desde sua introdução em 1990, a SPME continua a atrair o interesse de pesquisadores nas mais diversas áreas. Mas, apesar do grande número de trabalhos empregando esta técnica, a grande maioria dos métodos desenvolvidos utilizou a SPME com baixo rendimento (*low sample throughput*). Entenda-se aqui por “baixo rendimento” a extração de poucas amostras num determinado tempo, geralmente longo (CUDJOE et al., 2009). O rendimento da extração pode ser aumentado (*high sample throughput*) pelo aumento da eficiência da extração (reduzindo o tempo necessário para cada extração) ou pelo aumento da quantidade de amostras extraídas simultaneamente (n° de amostras por unidade de tempo) (MIRNAGHI et al., 2011).

De acordo com os princípios fundamentais, a quantidade de analito extraída por SPME é diretamente proporcional ao volume da fase extratora (*coating*) (PAWLISZYN, 2003):

$$n = \frac{K_{es} V_e V_s C_0}{K_{es} V_e + V_s}$$

n = quantidade do analito extraída
K_{es} = constante de partição do analito entre a fase extratora e a matriz
V_e = volume da fase extratora
V_s = volume da amostra
C_0 = concentração inicial do analito na amostra

Um aumento do volume da fase extratora pode ser alcançado pelo aumento do tamanho da camada desta fase sobre o suporte. Entretanto, o aumento da superfície de contato da fase extratora com a amostra também é importante (PAWLISZYN, 2003):

$$(dn/dt) = (D_s A/\delta) C_s t$$

(dn/dt) = taxa de extração
D_s = concentração do analito
A = área superficial da fase extratora
δ = largura da camada estacionária na fronteira entre a matriz e a fase de extração
C_s = concentração do analito
t = tempo de extração

Com a finalidade de aumentar a superfície de contato da fase extratora, a SPME pode ser empregada na configuração de um filme delgado (TFME, *Thin Film Microxtraction*); no modo *in tube*, utilizando um tubo capilar aberto de sílica fundida com a superfície interna revestida com a fase extratora; e *stir bar*, na qual uma barra de agitação magnética é recoberta por uma fina camada de fase extratora (BRUHEIM; LIU; PAWLISZYN, 2003; QUEIROZ, 2005). Mirnaghi et al., (2011) mostraram a configuração em que a SPME será empregada no presente trabalho. Os pesquisadores depositaram a fase extratora (C18, sílica quimicamente ligada a um grupo octadecil) com o auxílio de um polímero colante biocompatível (PAN, poliacrilonitrila) sobre finas lâminas retangulares de aço (*blades*), obtendo assim uma fase extratora com maior volume e superfície de contato (*thin film*) se comparado às tradicionais fibras de SPME (MIRNAGHI et al., 2011).

Com o intuito de aumentar o rendimento da SPME através do aumento do número de amostras extraídas simultaneamente, esforços foram empreendidos na automação do processo de extração. Em 2008, a automação da SPME/TFME para ser utilizada com HPLC foi viabilizada com o desenvolvimento de uma estação robótica (Concept 96, PAS Technology), com a qual é possível preparar 96 amostras simultaneamente e de maneira completamente

automatizada (VUCKOVIC et al., 2008). Esta tecnologia ainda está em desenvolvimento e, por isso, o custo ainda é elevado. Entretanto, a mesma empresa desenvolveu uma versão simplificada não automatizada (*SPME Multi-sampler,* Figura 1.5 C), mas com custo bastante reduzido se comparado a versão automatizada. Este equipamento foi empregado no desenvolvimento do presente trabalho.

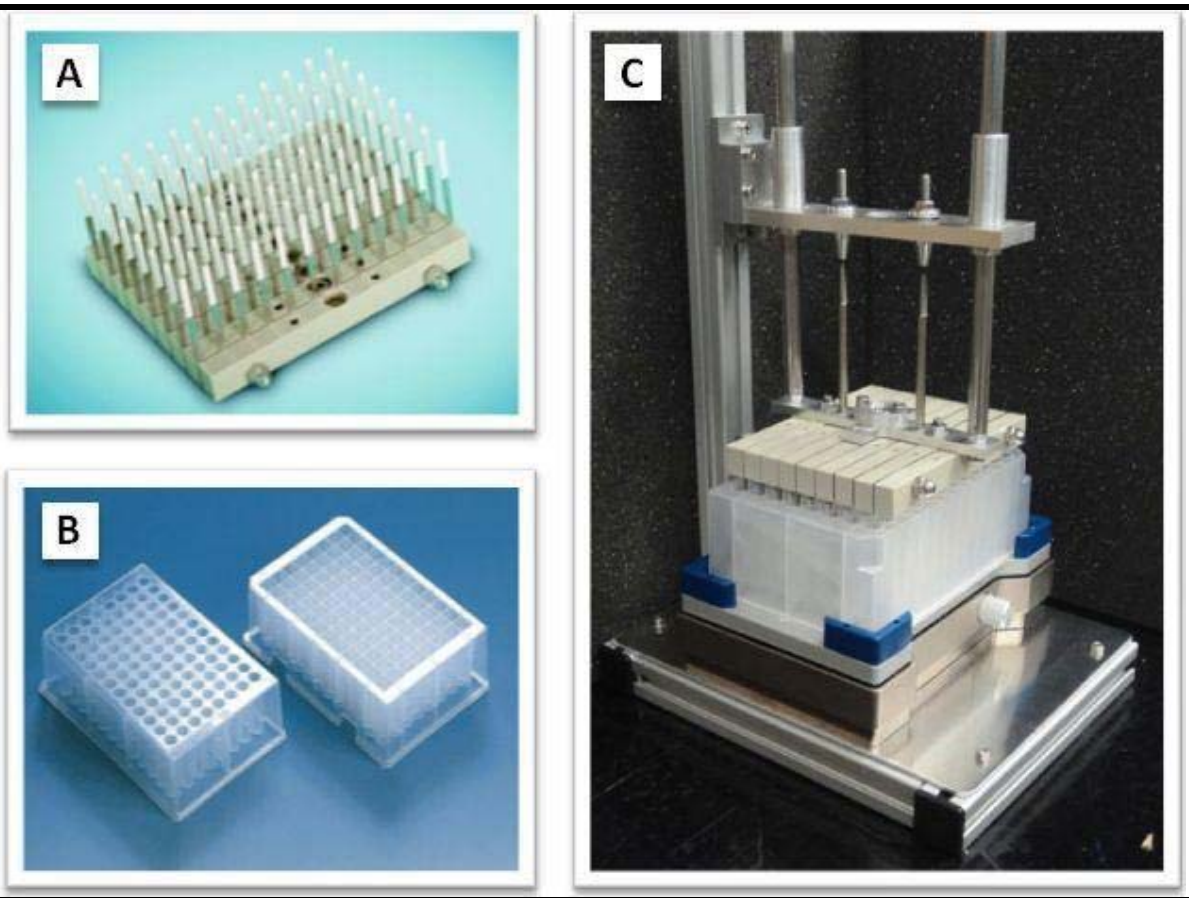


Figura 1.5 - Equipamentos utilizados para extração por SPME de 96 amostras simultaneamente. A) *Blades* (adaptado de Mirnaghi et al., 2011); B) 96-*well plate* (COLEPARMER, 2011); C) Estação do *SPME Multi-sampler*.

As principais vantagens do emprego da SPME/TFME para análise de substâncias em matrizes biológicas são: excelente *clean up* da amostra, devido à seletividade das fases extratoras, possibilidade de automação ou extração de várias amostras ao mesmo tempo e bons níveis de recuperação se comparado à SPME em fibra. Entretanto, o emprego de equipamentos de análise altamente sensíveis é imprescindível, caso os analitos de interesse tenham alta ligação aos componentes da matriz biológica e, consequente, baixas taxas de recuperação, pois a SPME é por definição uma técnica de equilíbrio e somente a fração livre pode ser extraída (VUCKOVIC et al., 2010). Caso se deseje determinar todo analito da

amostra, é necessário liberar o fármaco ligado aos componentes da matriz com procedimentos adicionais como, por exemplo, precipitação protéica com acetonitrila.

Para obter bons resultados empregando a SPME/TFME é preciso otimizar vários parâmetros que interferem na eficiência da extração. Alguns parâmetros são cruciais, levando a grandes diferenças na eficiência da extração; outros parâmetros são secundários, sendo sua otimização obrigatória ou não, dependendo das especificidades das aplicações (RISTICEVIC et al., 2010). A Figura 1.6 mostra os parâmetros a serem avaliados para uma adequada extração por SPME/TFME.

Figura. 1.6 - Parâmetros que interferem na extração por SPME/TFME. (VUCKOVIC et al., 2010; RISTICEVIC et al., 2010).

1.2. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DE FÁRMACOS QUIRAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Nas últimas três décadas, tem havido um interesse crescente da indústria farmacêutica e dos laboratórios analíticos no desenvolvimento de métodos analíticos enantiosseletivos para análise de fármacos quirais, devido às crescentes exigências de órgãos reguladores, mais especificamente o americano FDA (*Food and Drug Administration*). Estas crescentes exigências decorrem principalmente, dos diferentes efeitos terapêuticos ou tóxicos que dois enantiômeros podem ter. Várias técnicas analíticas foram empregadas para responder a esta necessidade e entre elas, HPLC e a eletroforese capilar (CE, *Capillary Electrophoresis*) ganharam maior destaque (ERNY; CIFUENTES, 2006; CASLAVSKA; THORMANN, 2011).

HPLC é a técnica analítica mais extensivamente aplicada à análise de compostos quirais (LOPES; GUARATINI, 2009; LÄMMERHOFER, 2010). A resolução dos enantiômeros por HPLC pode ser alcançada por métodos diretos e indiretos. Nos métodos indiretos é necessário que ocorra a reação do analito quiral de interesse com um agente de derivação quiral, o qual deve ser enantiomericamente puro, resultando na formação de diastereoisômeros, os quais são passíveis de resolução em fases estacionárias não quirais. Nos métodos diretos emprega-se fase móvel quiral ou fase estacionária quiral. Dessa forma, ocorre a formação de diastereoisômeros temporários na fase estacionária ou na fase móvel. O uso de fase móvel quiral é restrito, pois os aditivos quirais tem alto custo e podem gerar dificuldades na detecção dos analitos (MISLANOVÁ; HUTTA, 2003; HAGINAKA, 2002; ERNY; CIFUENTES, 2006). Portanto, a maneira mais empregada atualmente para obter a resolução dos enantiômeros é a utilização de colunas recheadas com fases estacionárias quirais (CSP, *Chiral Stationary Phases*) (LÄMMERHOFER, 2010).

Um dos fatores críticos para alcançar sucesso nas separações de enantiômeros é a seleção apropriada de uma CSP com habilidade para distinção estereosseletiva dos enantiômeros de um racemato. Mais de cem CSPs são hoje oferecidas comercialmente e dentre elas cerca de 20-30 CSPs, ou até menos, são mais frequentemente empregadas e juntas podem lidar com praticamente todos os problemas de separação de enantiômeros de várias classes de compostos (LÄMMERHOFER, 2010). Para a preparação destas fases estacionárias, vários tipos de seletores quirais vêm sendo utilizados. Os mais empregados são os polissacarídeos (amilose e celulose) e seus derivados, as proteínas, os antibióticos macrocíclicos e as ciclodextrinas. Os seletores quirais são incorporados ou imobilizados na

superfície de um suporte, geralmente a sílica, atuando como discriminadores quirais *in situ* (formação de diasteroisômeros transitórios) durante o processo cromatográfico (HAGINAKA, 2002; LÄMMERHOFER, 2010). A Tabela 1.1. mostra nove das principais fases estacionárias baseadas em polissacarídeos disponíveis comercialmente.

Tabela 1.1 - Principais seletores baseados em polissacarídeos disponíveis comercialmente. (Adaptado de LÄMMERHOFER, 2010)

Derivado polissacarídico	**Nome comercial / Empresa**
Tris(4-metilbenzoato) de celulose	Chiralcel OJ® / *Daicel - Chiral Technologies*
Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose	Chiralcel OD® / *Daicel - Chiral Technologies* Kromasil CelluCoat® / *EKA* Lux Cellulose-1® / *Phenomenex* RegisCell® / *Regis Technologies* Nucleocel delta® / *Macherey & Nagel* Eurocel 01® / *Knauer* Chiralpak IB® /*Daicel - Chiral Technologies*
Tris(3,5-diclorofenilcarbamato) de celulose	Chiralpak IC® / *Daicel - Chiral Technologies*
Tris(4-cloro-3-metilfenilcarbamato) de celulose	Chiralcel OZ® / *Daicel - Chiral Technologies*
Tris(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulose	Lux Cellulose-2® / *Phenomenex*
Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	Chiralpak AD® / *Daicel - Chiral Technologies* Kromasil AmyCoat® / *EKA* RegisPack® / *Regis Technologies* Nucleocel alpha® / *Macherey & Nagel* Europak 01® / *Knauer* Chiralpak IA® / *Daicel - Chiral Technologies*
Tris((S)-alfa-metilbenzilcarbamato) de amilose	Chiralpak AS® / *Daicel - Chiral Technologies*
Tris(2-cloro-5-metilfenilcarbamato) de amilose	Chiralpak AY® / *Daicel - Chiral Technologies*
Tris(5-cloro-2-metilfenilcarbamato) de amilose	Lux Amylose-2® / *Phenomenex*

A cromatografia líquida quiral pode ser desenvolvida empregando diferentes modos de eluição: modo normal, reverso e polar-orgânico (PÉREZ; BARCELO, 2008). No modo de eluição normal, a fase móvel é composta apenas por solventes orgânicos, normalmente

hexano e um álcool. No modo de eluição reverso as fases móveis são compostas por soluções aquosas e solventes orgânicos miscíveis, geralmente acetonitrila e metanol. O modo polar orgânico tem como característica fundamental o uso de fases móveis compostas por solventes orgânicos polares puros ou em misturas. Os solventes mais empregados são acetonitrila, metanol e etanol (TACHIBANA; ONISH, 2001). No modo normal e polar orgânico, a análise de compostos ácidos e básicos geralmente requer a presença de um aditivo ácido (ácido trifluoracético, ácido acético, etc) ou básico (dietilamina) para evitar a interação desses compostos com os grupos silanóis residuais da sílica que é empregada como suporte para o seletor quiral. Na análise de compostos ácidos e básicos por fase reversa, a ionização desses compostos é evitada pelo emprego de soluções aquosas acidificadas ou tamponadas. Pode-se também analisar compostos básicos na forma protonada, através do emprego de um reagente capaz de formar pares iônicos (perclorato de sódio).

Todos os detectores utilizados em HPLC aquiral têm aplicações na análise de fármacos quirais. Em especial, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* ou LC-MS-MS, *Liquid Chromatography-Tanden Mass Spectrometry*) tem se mostrado uma ferramenta poderosa nesta área, devido à sua seletividade e detectabilidade, especialmente quando se trata de matrizes biológicas (CHEN; KORFMACHER; HSIEH, 2005; ERNY; CIFUENTES, 2006; PÉREZ; BARCELO, 2008; YIWEN, et al., 2010). Classicamente, os métodos empregando LC-MS utilizam o modo reverso de eluição. No entanto, em análises quirais, o uso do modo normal é muitas vezes necessário, dificultando a detecção por MS com fontes de ionização por eletronebulização (ESI, *Electrospray Ionization*) e ionização química a pressão atmosférica (APCI, *Atmospheric-pressure Chemical Ionization*). Nesse caso, cuidados adicionais devem ser tomados, pois os solventes orgânicos inflamáveis que compõem a fase móvel (misturas de alcanos e alcoóis) em vazões elevadas, levam a riscos de explosão associados principalmente com a fonte APCI. Além disso, a ionização dos analitos nas duas fontes é prejudicada. Para contornar estes problemas, pode-se lançar mão de algumas estratégias, sendo que a principal delas é o emprego de misturas pós-coluna com fases móveis mais adequadas (tampão acetato de amônia:2-propanol, por exemplo), antes do efluente da coluna entrar na interface do MS. Isso reduz os riscos de explosão e também melhora a ionização do analito (PÉREZ; BARCELO, 2008; BAKHTIAR; RAMOS; TSE, 2001).

1.3. METABOLISMO *IN VITRO* DE FÁRMACOS

Embora os enantiômeros de uma determinada substância tenham propriedades físico químicas idênticas (com a exceção da sua interação com a luz plano polarizada), eles podem diferir em suas propriedades biológicas devido à sua interação estereosseletiva com enzimas, proteínas, receptores e outras moléculas de ocorrência natural que têm centros quirais em suas estruturas químicas. Assim, tanto os efeitos farmacológicos desejados quanto os efeitos biológicos indesejados, como, por exemplo, toxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade e desregulação endócrina podem ser oriundos de um dos enantiômeros de um determinado fármaco ou seu metabólito (PÉREZ; BARCELO, 2008). A interação dos dois enantiômeros com as enzimas responsáveis pela biotransformação quase sempre é estereosseletiva. Outros processos farmacocinéticos como absorção, eliminação e distribuição também podem ser estereosseletivos Mesmo assim, aproximadamente 50% dos fármacos atualmente utilizados na terapêutica clínica são administrados como racematos (CAMPO; BERNARDES; CARVALHO, 2009;).

Entretanto, à medida que as pesquisas avançam, tanto no que se refere a pesquisas pré-clinicas para novos fármacos, quanto em estudos pós-comercialização, vem aumentando a quantidade de fármacos comercializados na forma enantiomérica pura. É o caso do (R)-albuterol, (S)-ofloxacina, (S)-repaglinida, (R)-cetirizina, (S)-esomeprazol, (S)-clopidogrel e (3R,5R) atorvastatina, entre vários outros, sendo estes últimos três os mais rentáveis para a indústria no ano de 2008, com vendas em torno dos 30 bilhões de dólares. (AGRANAT; WAINSCHTEIN, 2010) AGRANAT; CANER; CALDWELL, 2002).

Para a tomada da decisão entre produzir um fármaco na forma de racemato ou enantiômero puro, é necessário estabelecer se as propriedades cinéticas e dinâmicas são esterosseletivas. O metabolismo normalmente é estereosseletivo e, portanto, precisa ser cuidadosamente avaliado.

O estudo do metabolismo de fármacos pode ser feito empregando modelos *in vivo* (animais, voluntários sadios, pacientes) ou modelos *in vitro*. A busca pelo desenvolvimento de modelos *in vitro* se sustenta em aspectos éticos, científicos e econômicos. Modelos *in vitro* são mais simples e particularmente úteis para seleção racional de espécies animais, para estudos toxicológicos e para a comparação de perfis metabólicos. Apesar de existirem diferenças no perfil enzimático de animais e humanos, existem estudos que correlacionam esses resultados e o emprego de espécies roedoras é bem aceito (KOBAYASHI et al., 2002).

No entanto, esta extrapolação deve ser feita com cautela porque diferenças significativas nos perfis metabólicos podem existir para determinados fármacos (EKINS et al., 2000).

As reações envolvidas no metabolismo normalmente aumentam a polaridade das substâncias, tornando-as mais hidrossolúveis e, portanto, mais facilmente excretadas. O processo de metabolização envolve duas fases: fase I relacionada, principalmente, às enzimas do citocromo P450 (CYP450), compreendendo reações de oxidação, redução e hidrólise; e fase II, a qual compreende as reações de conjugação que são mediadas por ação de transferases (ZAMEK-GLISZCZYNSKI et al., 2006; GOMEZ-LECHON; CASTELL; DONATO, 2007). Em alguns processos metabólicos, podem ser gerados metabólitos ativos os quais tem igual ou maior atividade farmacológica que a molécula precursora. Infelizmente, este processo também pode ativar certos substratos, tais como potenciais agentes cancerígenos, através da transformação do xenobiótico em espécies eletrofílicas capazes de interagir com moléculas biológicas, tais como o DNA, causando mutações e, por vezes, carcinogênese (KUMAR; SURAPANENI, 2001; LI, 2005;). Desta forma, a ativação ou inibição de isoenzimas CYP por fármacos podem levar a interações fármaco-fármaco e fármaco-alimento, muitas vezes negligenciadas. Pelo exposto, a investigação sobre estes fenômenos é um campo emergente em farmacologia e toxicologia (BROWN; REISFELD; MAYENO, 2008).

Diversos modelos para estudos de metabolismo *in vitro* são descritos na literatura, sendo os principais: superssomas, frações citosólicas de fígado, frações S9, culturas celulares, hepatócitos e microssomas hepáticos. Vários desses modelos, como microssomas hepáticos, exigem a presença de fatores exógenos para sua atividade. Esses fatores consistem do sistema de regeneração NADPH (fase I)) e ácido uridina-5′-difosfo-α-D-glucuronico (UDPGA; fase II) (BRANDON et al., 2003; ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

O microssoma hepático é o modelo experimental de metabolismo *in vitro* mais extensivamente empregado. Os microssomas são frações subcelulares derivados do retículo endoplasmático de células hepáticas e são preparados por centrifugação fracionada de homogeneizados de fígado (LI, 2005; PELKONEN,1974). Essas frações subcelulares são ricas fontes de enzimas metabolizadoras, sendo as enzimas do CYP 450 e transferases as de maior relevância. Portanto, a fração microssomal permite estudar reações de metabolismo de fases I e fase II pela adição de cofatores apropriados (ASHA; VIDYAVATHI, 2010). Além disso, este modelo possibilita o estudo da influência de isoenzimas específicas na presença de inibidores seletivos (YOUDIM et al., 2008).

As principais vantagens do emprego de microssomas hepáticos em estudos de metabolismo *in vitro* incluem: baixo custo, simplicidade, fácil armazenamento (a atividade enzimática pode ser mantida por um longo período de tempo sob congelamento), modelo *in vitro* mais bem caracterizado para a investigação do metabolismo de fármacos, novos metabólitos podem ser produzidos e a variação interindividual também pode ser estudada. As desvantagens incluem: inadequação para estimativas quantitativas da biotransformação *in vivo* por causa da presença de enzimas CYPs e UGTs em elevadas concentrações não, permitindo a competição com outras enzimas; a ausência de outras enzimas, tais como NAT (N-acetil transferases), ST (sulfo transferases), GST (glutationa-S-transferase); e variações nas condições de incubação, tais como a força iônica, valor do pH do meio de incubação e o efeito de solventes orgânicos utilizados podem afetar significativamente o perfil metabólico oriundo dos microssomas (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

1.4. OBJETIVOS GERAIS DO PROJETO

Desenvolvimento e validação de métodos de análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos quirais anfotéricos (repaglinida), neutro (isradipina) e básico (bufuralol e ranolazina) em meio microssomal de fígado de ratos e humano, empregando técnicas miniaturizadas de preparação de amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRANAT, I.; CANER, H.; CALDWELL, A. Putting chirality to work: The strategy of chiral switches. **Nature Reviews Drug Discovery, v.** 1, p. 753-768, 2002.

AGRANAT I.L; WAINSCHTEIN S. R. The strategy of enantiomer patents of drugs. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 163-170, 2010.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v.62, p. 2145-2148, 1990.

ASHA, A; VIDYAVATHI, M. Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs -A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1699–1722, 2010.

BAKHTIAR, R.; RAMOS, L.; TSE, F.L.S. Use of atmospheric pressure ionization mass spectrometry in enantioselective liquid chromatography. **Chirality**, v. 13, p. 63-74, 2001.

BRANDON, E. F. A; RAAP, C. D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 189, p. 233-246, 2003.

BROWN, C. M; REISFELD, B.; MAYENO, A. N. Cytochromes p450: A structure-based summary of biotransformations using representative substrates. **Drug Metabolism Review,** v.40, p.1-100, 2008.

BRUHEIM, I.; LIU, X.; PAWLISZYN, J. Thin-film microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 1002-1010, 2003.

CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; CACHO, J. I.; PEÑALVER, R.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Evaluation of dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of chlorophenols and haloanisoles in wines and cork stoppers using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7323-7330, 2010.

CAMPO, V. L.; BERNARDES, L. S. C.; CARVALHO, I. Stereoselectivity in Drug Metabolism: Molecular Mechanisms and Analytical Methods. **Current Drug Metabolism**, v.10, p.188-205, 2009.

CASLAVSKA, J.; THORMANN, W. Stereoselective determination of drugs and metabolites in body fluids, tissues and microsomal preparations by capillary electrophoresis (2000–2010). **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 588–601, 2011.

CHEN, H.; CHEN, H.; YING, J.; HUANG, J.; LIAO, L. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 80-85, 2009.

CHEN, H.; YING, J.; CHEN, H.; HUANG, J.; LIAO, L. LC determination of chloramphenicol in honey using dispersive liquid-liquid microextraction. **Chromatographia**, v. 68, p. 629-634, 2008.

CHEN, J.W.; KORFMACHER, W.A.; HSIEH, Y. Chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for stereoisomeric pharmaceutical determinations. **Journal of Chromatography B**, v.820, p.1-8, 2005.

COLEPARMER. Catálogo de produtos. Disponível em: <http://www.coleparmer.com>. Acesso em: 28 novembro de 2011.

CUDJOE, E.; VUCKOVIC, D.; HEIN, D.; PAWLISZYN, J. Investigation of the Effect of the Extraction Phase Geometry on the Performance of Automated Solid-Phase Microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 4226–4232, 2009.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Técnicas de microextração aplicadas à análise estereosseletiva do ibuprofeno, da hidroxicloroquina e dos seus metabólitos em urina. 2007. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

EKINS, S.; RING, B. J.; GRACE, J.; MCROBIE-BELLE, D. J.; WRIGHTON, S. A. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.44, p.313-324, 2000.

ERNY, G. L.; CIFUENTES, A. Liquid separation techniques coupled with mass spectrometry for chiral analysis of pharmaceuticals compounds and their metabolites in biological fluids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 40, p. 509–515, 2006.

FARAJZADEH, M. A.; BAHRAM, M.; JÖNSSON, J. A. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-diode array detection as an efficient and sensitive technique for determination of antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 591, p. 69-79, 2007.

FARAJZADEH, M. A.; VARDAST, M. R.; BAHRAM, M. Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction of irganox 1010 and irgafos 168 from polyolefins before liquid chromatographic analysis. **Chromatographia**, v. 69, p. 409-419, 2009.

FARHADI, K.; MATIN, A. A.; HASHEMI, P. LC determination of trace amounts of phenoxyacetic acid herbicides in water after dispersive liquid-liquid microextraction. **Chromatographia**, v. 69, p. 45-49, 2009.

GOMEZ-LECHON, M. J.; CASTELL, J. V.; DONATO, M. T. Hepatocytes—the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: In vitro variability as a reflection of in vivo. **Chemico-Biological Interactions**, v. 168, p. 30–50, 2007.

HAGINAKA, J. Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using liquid chromatographic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.27, p.357-372, 2002.

JEANNOT, M. A.; CANTWEEL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 2236-2240, 1996.

KOBAYASHI, K.; URASHIMA, K,; SHIMADA, N.; CHIBA, K. Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat. **Biochemical Pharmacology**, v.63, p. 889-896, 2002.

KRAMER, K. E.; ANDREWS, A. R. J. Screening method for 11-nor-Δ9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using hollow fiber membrane solvent microextraction with in-tube derivatization. **Journal of Chromatography B**, v. 760, p. 27-36, 2001.

KUMAR, G. N.; SURAPANENI, S. Role of drug mestabolism in drug Discovery and development. **Medicinal Research Reviews**, v. 20, p. 397-411, 2001.

LÄMMERHOFER, M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 814–856, 2010.

Li, A. P. Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties. **Drug Discovery Today:Technologies**, v. 2, p. 179–185, 2005.

LOPES, N. P.; GUARATINI, T. **Analytical Chemistry for Pharmaceutical and Medical Sciences.** Transworld Research Network, 1° ed. Kerala, Índia, 2009.

MAGALHÃES, I. R. S.; BONATO, P. S. Liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the enantioselective analysis of mefloquine in plasma samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 929-936, 2008.

MAGALHÃES, I. R. S.; BONATO, P. S. Two-step liquid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for the simultaneous analysis of the enantiomers of mefloquine and its main metabolite carboxymefloquine in plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 1805-1813, 2009.

MAGALHÃES, I. R. S.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Fundamentos e avanços recentes da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (LPME). **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 4, 2009.

MIRNAGHI, S. F.; CHEN, Y.; SIDISKY, L. M.; PAWLISZYN, J. Optimization of the Coating Procedure for a High-Throughput 96-Blade Solid Phase Microextraction System Coupled with LC–MS/MS for Analysis of Complex Samples. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 6018–6025, 2011.

MISLANOVA, C.; HUTTA, M. Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B** v.797, p.91-109, 2003.

PAWLISZYN, J. Sample Preparation: Quo Vadis? **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 2543-2558, 2003.

PAWLISZYN, J.; LORD, H. L (ed). **Handbook of Sample Preparation**. Wiley, Danver, United States, 2010.

PEDERSEN-BJERGAARD S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 2650-6, 1999.

PELKONEN, O.; KALTIALA, E. H.; LARMI, T. K.; KARKI, N. T. Cytochrome P450 linked monooxygenase system and drug-induced spectral interactions in human liver icrosomes. **Chemico- Biological Interactions**, v. 9, p. 205–216, 1974.

PÉREZ, S; BARCELO, D. Applications of LC-MS to quantitation and evaluation of the environmental fate of chiral drugs and their metabolites. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, no. 10, p. 836-846, 2008.

PSILLANKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v .22, p. 565-74, 2003.

QUEIROZ, M. E. C. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida "no tubo" e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 28, p. 880-886, 2005.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 1-10, 2004.

REZAEE, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. R. M.; AGHAEE, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction, **Journal of Chromatography A** , v. 1116, p. 1-9, 2006.

REZAEE, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2342–2357, 2010.

RISTICEVIC, S.; LORD, H. L.; GORECKI, T.; ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Protocol for solid phase microextraction method development. **Nature Protocols**, v. 5, p. 122–139, 2010.

SUNA, J.; SHIA, Y.; CHENA, J. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for sensitive determination of tracecelastrol in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 3429-3433, 2011.

TACHIBANA, K.; ONISH, A. Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 906, p.127-154, 2001.

VUCKOVIC, D.; CUDJOE, E.; HEIN, D.; PAWLISZYN, J. Automation of solid-phase microextraction in high-throughput format and applications to drug analysis. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 6870–6880, 2008.

VUCKOVIC, D.; CUDJOE, E.; MUSTEATA, M. F.; PAWLISZYN, J. Automated solid-phase microextraction and thin-film microextraction for high-throughput analysis of biological fluids and ligand–receptor binding studies. **Nature Protocols**, v.5, p. 140-161, 2010.

WEI, G.; LI, Y.; WANG, X. Application of dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of methomyl in natural waters. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3262-3267, 2007.

WU, Q.; LI, Y.; WANG, C.; LIU, Z.; ZANG, X.; ZHOU, X.; WANG, Z. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of carbendazim and thiabendazole in environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 638, p. 139-145, 2009.

YIWEN, Z.; SHUN, Y; HAO, Z. Chiral Separation of Pharmaceuticals by High Performance Liquid Chromatography. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 114-130, 2010.

YOUDIM, K. A.; DICKINS, M.; PHIPPS, A.; DAREKAR, A.; HYLAND, R.; FAHMI, O.; HURST, S.; COOK, J.; PLOWCHALK, D.; GUO, F.; OBACH, S. Application of CYP3A4 *in vitro* data to predict clinical drug–drug interactions; predictions of compounds as objects of interaction. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.65, p.680-692, 2008.

ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J.; HOFFMASTER, K. A.; NEZASA, K.; TALLMAN, M. N.; BROUWER, K. L. R. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. **European Journal Pharmaceutical Science**, v.27, p.447-486, 2006.

ZHOU, Q.; PANG, L.; XIAO, J. Trace determination of dichlorodiphenyltrichloroethane and its main metabolites in environmental water samples with dispersive liquid-liquid microextraction in combination with high performance liquid chromatography and ultraviolet detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6680-6684, 2009.

ZHU, L.; LEE, H. K. Liquid–liquid–liquid microextraction of nitrophenols with a hollow fiber membrane prior to capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v, 924, p. 407-414, 2001.

Capítulo 2

Análise enantiosseletiva da isradipina e do seu principal metabólito em meio microssomal empregando HF-LPME-HPLC.

2.1. ISRADIPINA

Bloqueadores dos canais de cálcio (CCBs), também chamados de antagonistas do cálcio, são muito utilizados para o tratamento da hipertensão, disritmia cardíaca e angina (ROSA et al., 2000; THADANI et al., 1994). Para o tratamento da hipertensão, eles são prescritos sozinhos ou em combinação com outros fármacos como diuréticos, β-bloqueadores, antagonistas da angiotensina II e outros vasodilatadores. O uso concomitante com outros fármacos pode resultar em interações clinicamente importantes. Por exemplo, a combinação de CCBs com β-bloqueadores pode diminuir drasticamente a pressão sanguínea (MUELLER; GONZÁLEZ; WEINMANN, 2004).

Os CCBs derivados da 1,4-diidropiridina (DHP) (ex. isradipina, nifedipina, nilvadipina, nisoldipina, lacidipina e lercanidipina) são metabolizados pelo sistema citocromo P450, mais especificamente pela isoforma CYP3A4, resultando na formação de metabólitos derivados da piridina e outros (GUENGERICH et al. 1991; CHRISTENSEN et al., 2000).

Com exceção da nifedipina e lacidipina, todos os outros DHP atualmente aprovados para uso em humanos são compostos quirais e têm sido usados clinicamente como misturas racêmicas dos dois enantiômeros. Entretanto, estudos têm demonstrado que os enantiômeros de derivados DHP podem apresentar diferenças significativas nos efeitos farmacológicos, além de apresentarem diferentes perfis farmacocinéticos e de metabolismo (MIELCAREK, 2001; MIKUS et al., 1995).

A isradipina (ISR) é uma potente DHP utilizada no tratamento da hipertensão e da angina pectoris (ROSA et al., 2000; THADANI et al., 1994). Este fármaco está disponível comercialmente na forma de mistura racêmica dos enantiômeros (+)-(S)- and (−)-(R)-, embora a atividade farmacodinâmica do (+)-(S)-ISR seja 150 vezes maior do que (-)-(R)-ISR

(HOF; RUEGG, 1988). O principal metabólito da ISR, uma piridina derivada da isradipina (PDI), é formado por desidrogenação, resultando na perda de seu centro quiral (Figura 2.1) (GUENGERICH et al., 1991; BIDOUIL; DUBOIS; HANOCQ, 1997). Guengerich et al. (1991) investigaram o metabolismo *in vitro* de vários fármacos da classe das DHPs, dentre eles a ISR, empregando microssomas humanos. Apesar de pouco específico, o mérito do trabalho reside na identificação de vários metabólitos das DHP, desconhecidos até então. Além disso, foi possível a identificação da isoforma CYP3A4 como a principal responsável pelo metabolismo das DHP. O outro estudo de metabolismo *in vitro* da ISR foi desenvolvido empregando cultura de hepatócitos (BIDOUIL; DUBOIS; HANOCQ, 1997). Neste trabalho, os pesquisadores desenvolveram um método por HPLC para monitorar 5 possíveis metabólitos da ISR, entretanto, na aplicação do método em amostras reais de metabolismo com as culturas celulares só foi possível a detecção e quantificação do PDI. Ambos os trabalhos acima citados não fazem menção nenhuma à enantiosseletividade do processo. Portanto, torna-se importante a investigação da possível enantiosseletividade no metabolismo da ISR.

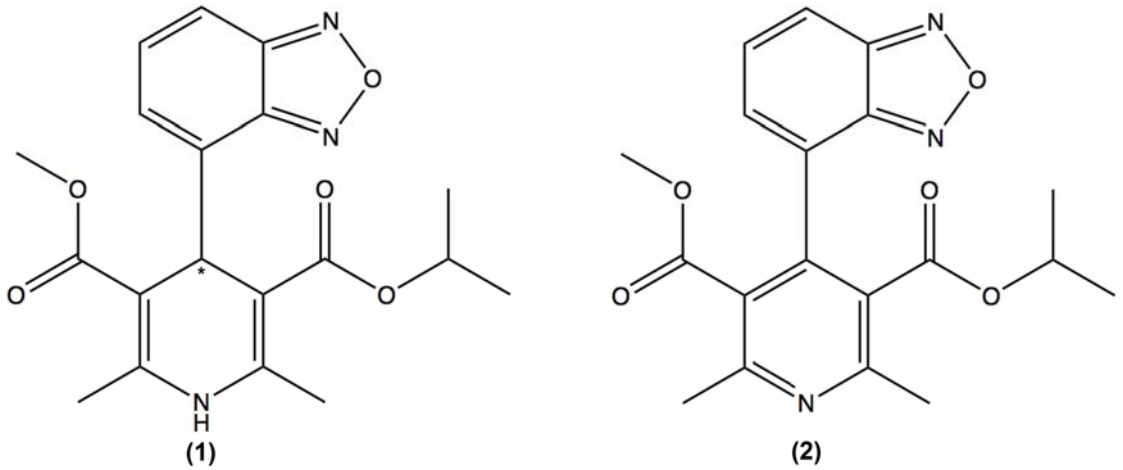


Figura 2.1 – Estruturas químicas da isradipina (1) e seu metabólito (2); *centro quiral.

No que tange à análise enantiosseletiva da ISR, somente quatro métodos são descritos na literatura (BARBATO et al., 2000; BOATTO et al., 2003; RASK; ANGELO; CHRISTENSEN, 1998; WELCH; SZCZERBA; PERRIN, 1997) sendo que apenas um trata da análise da ISR em fluidos biológicos (RASK; ANGELO; CHRISTENSEN, 1998). Neste método, a separação enantiosseletiva da ISR foi realizada por HPLC usando uma coluna Chiralcel OJ®. A fim de obter detectabilidade suficiente para quantificar os enantiômeros em

amostras de plasma, as frações contendo os enantiômeros da ISR foram analisadas por cromatografia gasosa com detector termiônico. Para a preparação das amostras foi utilizada a LLE, com recuperação de 40%. O limite de quantificação alcançado foi de 0,26 ng mL^{-1}. No entanto, o método é demorado, quase 3 h para análise, pois é necessária a coleta dos picos de cada analito em 6 corridas cromatográficas diferentes de cada enantiômero por HPLC (120 min) para posterior análise por cromatografia gasosa (30 min). Portanto, até agora, nenhum método empregando HPLC com detecção por absorção no UV ou outro tipo de detector foi descrito na literatura para determinar simultaneamente os enantiômeros da ISR e a PDI.

Com base nesse contexto, a HF-LPME foi utilizada como técnica de preparação de amostra no desenvolvimento de um método adequado para a análise enantiosseletiva da ISR e PDI, com aplicação em estudos de metabolismo *in vitro* utilizando microssomas hépáticos de fígado de ratos.

2.2. OBJETIVOS

Desenvolvimento de uma metodologia analítica empregando HPLC com fases estacionárias quirais e a HF-LPME como técnica de preparação das amostras para a determinação dos enantiômeros da ISR e do seu principal metabólito em fração microssomal de fígado de ratos, com aplicação em um estudo de metabolismo *in vitro*.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1. Soluções-padrão

Os padrões do fármaco ISR e do seu metabólito foram adquiridos da Farmacopéia Britânica (Stanmore, Reino Unido). A oxibutinina, empregada como padrão interno, foi gentilmente cedida por Watson Laboratories (Corona, EUA). As soluções-padrão foram preparadas em metanol grau HPLC (Mallinckrodt, Phillipsburg, EUA) e armazenadas à temperatura de -20 °C, protegidas da ação da luz. Desta forma as soluções são estáveis por pelo menos 4 semanas (AL-SUWAYEH, 2002).

2.3.2. Análise cromatográfica - Instrumentação e condições analíticas

As análises cromatográficas foram feitas empregado o equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Kioto, Japão), composto de uma bomba LC-10AS, um injetor Rheodyne (Cotati, EUA) modelo 7725i com amostrador de 20 µL, um detector por absorção no UV-Vis, modelo SPD-10A, uma controladora SCL-10A VP Shimadzu (Kioto, Japão) e o sistema de aquisição e tratamento de dados com o software Lcsolution Versão 1.22SP1.

A separação do PDI e dos enantiômeros da ISR foi avaliada em colunas com fases estacionárias baseadas em derivados de amilose, celulose e antibiótico macrocíclico (Tabela 2.1.). As separações foram avaliadas em condições de fase normal, empregando fases móveis constituídas por hexano (60% de n-hexano, Mallinckrodt, Phillipsburg, EUA), 2-propanol (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA) e etanol (J. T. Baker, Phillipsburg, EUA). Separações no modo polar orgânico também foram avaliadas usando fases móveis constituídas por 2-propanol, etanol, acetonitrila e metanol, fornecidos por Mallinckrodt (Phillipsburg, EUA).

O parâmetro cromatográfico utilizado para avaliação da separação foi a resolução (Rs). A resolução foi calculada segundo a equação: $Rs = 2(t_{R2} - t_{R1})/wb_1 + wb_2$. Onde t_{R2} é o tempo de retenção do enantiômero mais retido e t_{R1} do menos retido, wb_1 e wb_2 são as respectivas larguras das bases dos picos, calculadas pelo método da tangente (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH; 1997).

O comprimento de onda para detecção foi de 325 nm. A vazão empregada foi ajustada conforme a viscosidade da fase móvel, a fim de evitar que a pressão gerada ultrapassasse o

limite estabelecido para cada coluna e, ao mesmo tempo, que a análise se tornasse muito longa. As análises foram efetuadas a temperatura ambiente controlada (25 ºC).

Da solução-padrão na concentração de 100 µg mL^{-1}, 25 µL foram evaporados a secura sob fluxo de ar comprimido e os resíduos foram dissolvidos em 100 µL de fase móvel para posterior análise de 20 µL.

Tabela 2.1- Colunas cromatográficas avaliadas para análise da ISR e PDI.

Coluna	Polissacarídeo	Seletor Quiral
Chiralcel OJ-H® * (5 µm, 150×4,6 mm)	Celulose	tris (4-metilbenzoato)
Chiralcel OG® * (10 µm, 250×4,6 mm)	Celulose	tris (4-metilfenilcarbamato)
Chiralpak AD® * (10 µm, 250×4,6 mm)	Amilose	tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)
Chirobiotic V® ** (5 µm, 250×4,6 mm)	---------	Vancomicina

* Chiral Technologies Inc. (Exton, EUA) ; ** Astec Inc. (Whippany, EUA)

Para proteger a coluna cromatográfica nas análises de amostras biológicas foi utilizada uma coluna de guarda CN LiChrospher® (4 x 4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) constituída por partículas de sílica modificada com grupos cianopropil (5 µm).

2.3.3. Microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (HF-LPME)

2.3.3.1. Equipamentos, reagentes e solventes

Para a realização dos experimentos empregando HF-LPME foi utilizado um agitador Vibrax VXR basic IKA (Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanha). Um sistema de purificação de água Milli-Q plus (Millipore/Millipore Corporation, Bedford, EUA) forneceu água livre de resíduos orgânicos e inorgânicos para preparação das soluções. Membranas capilares de polipropileno Accurel PP Q 3/2 (diâmetro interno de 600 µm, parede com espessura de 200 µm, poros de 0,2 µm, Membrana, Wuppertal, Alemanha) foram utilizadas para as microextrações.

Os reagentes grau P.A. empregados na preparação das soluções foram: fosfato monossódico monoidratado e fosfato dissódico diidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha),

hidróxido de sódio (Spectrum, New BrunswicK, EUA), ácido perclórico (Nuclear, São Paulo, Brasil) e cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os solventes utilizados na extração foram éter hexílico (Alfa Aesar, Ward Hill, EUA), n-octanol, éter butílico e acetato de hexila (Sigma, St. Louis, EUA).

2.3.3.2. Otimização do procedimento da HF-LPME

Para a otimização da HF-LPME empregou-se 1 mL do meio microssomal de fígado de ratos o qual consiste de: 716 µL de tampão fosfato de sódio 0,5 mol L^{-1} (pH 7,4), 250 µL de tampão Tris-HCl (50 mmol L^{-1}/KCl 0,154 mol L^{-1}, pH 7,4) e 34 µL de microssomas hepáticos de ratos para obter uma concentração de 1 mg de proteínas mL^{-1}. Definida a composição da amostra biológica, 1 mL desta amostra foi fortificado com 25 µL das soluções-padrão da rac-ISR e PDI nas concentrações de 100 µg mL^{-1}, incubado por 15 min a 37 °C e, em seguida, 400 µL de ácido perclórico 6% (v/v) foram adicionados, resultando em pH 2 da amostra. Este procedimento foi realizado com o objetivo de mimetizar as condições em que o metabolismo seria conduzido. O pH da amostra foi então ajustado para 7,0 utilizando uma solução de NaOH 2 mol L^{-1} e o volume final de 4 mL foi ajustado utilizando água purificada no sistema Milli-Q. A membrana de polipropileno (10 cm) foi fixada nas extremidades de ponteiras plásticas e imersa no solvente de extração (n-octanol, éter hexílico, éter butílico ou acetato de hexila) por 10 segundos; o excesso do solvente foi removido mergulhando a membrana em um banho ultrassônico por 10 segundos. Em seguida, utilizando uma microsseringa, 35 µL do mesmo solvente usado na impregnação foram introduzidos no lúmen da membrana, a qual foi então imersa na amostra. A extração foi conduzida sob agitação (500, 750, 1000, 1250 ou 1500 rpm) por um determinado tempo (10, 20, 30 45 ou 60 min) e ao final, o microextrato foi recolhido da membrana com auxílio de uma microsseringa e transferido para um tubo cônico de vidro âmbar. A adição de NaCl na fase doadora também foi avaliada (0, 5 e 10%). O extrato foi levado a secura sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi dissolvido em 50 µL de fase móvel e 20 µL foram injetados no sistema cromatográfico.

As recuperações foram calculadas relacionando as áreas de cada pico dos analitos após a extração com a área dos picos de soluções-padrão dos analitos injetadas diretamente no sistema cromatográfico.

2.3.4. Validação do método cromatográfico

2.3.4.1. Soluções-padrão

As soluções-padrão de *rac*-ISR and PDI foram preparadas em metanol nas concentrações de 4, 12, 36, 72, 116, 150 e 200 μg mL^{-1} e 2, 6, 24, 76, 120, 150 e 200 μg mL^{-1}, respectivamente. A solução do padrão interno (PI), *rac*-oxibutinina, foi preparada em metanol na concentração de 12 μg mL^{-1}. As soluções foram armazenadas a temperatura de -20 °C e protegidas da ação da luz.

2.3.4.2. Curva analítica e linearidade

Alíquotas de 1 mL do meio de incubação (*descrito na seção 2.3.3.2 deste capítulo*) foram fortificadas com 25 μL das soluções-padrão da *rac*-ISR e PDI. Obteve-se assim concentrações finais no meio microssomal de 50, 150, 600, 1900, 3000, 3750 e 5000 ng mL^{-1} para PDI e 50, 150, 450, 900, 1450, 1875, 2500 ng mL^{-1} para cada enantiômero da ISR. As amostras foram então submetidas ao procedimento de microextração e analisadas por HPLC (todos os pontos foram analisados em triplicata). A melhor relação entre os pontos foi obtida através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

2.3.4.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com exatidão (erro relativo) e precisão (coeficiente de variação percentual (CV%)) inferiores a 20%, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e o *Food and Drug Administration* (FDA, 2001). Para sua determinação, 5 alíquotas de 1 mL de meio de incubação fortificadas com 50 ng mL^{-1} de cada enantiômero da ISR e do PDI foram analisadas com base em uma curva analítica preparada simultaneamente.

2.3.4.4. Recuperação

Para determinar a porcentagem recuperada dos analitos após o processo de extração, as amostras do meio microssomal foram fortificadas com 150, 1900 e 3750 ng mL^{-1} do PDI e com 150, 900 e 1875 ng mL^{-1} de cada enantiômero da ISR (n = 3 para cada concentração). Essas amostras foram extraídas e analisadas juntamente com outras amostras similares (mesmas concentrações) preparadas diretamente na fase móvel. As recuperações foram calculadas através da comparação das áreas de cada composto nas amostras submetidas e não submetidas ao procedimento de extração.

2.3.4.5. Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram determinadas através da avaliação intradia (*n*=5) e interdias (*n*=3). Para isso foram empregadas amostras de meio de incubação fortificadas com o PDI e os enantiômeros da ISR nas concentrações de 150, 1900 e 3750 ng mL^{-1} e com 150, 900 e 1875 ng mL^{-1}, respectivamente. Os resultados obtidos foram expressos como coeficiente de variação percentual (CV%) para a determinação da precisão e como erro relativo (E%) para a determinação da exatidão do método.

2.3.4.6. Estabilidade

A estabilidade dos analitos foi avaliada expondo-os sobre a bancada por 12 horas à temperatura ambiente (25 °C±2) e submetendo-os à incubação (37 °C por 60 min) sem a presença do sistema de regeneração NADPH. Para estes testes foram avaliadas amostras contendo concentrações de 150 e 3750 ng mL^{-1} do PDI e 150 e 1875 ng mL^{-1} de cada enantiômero da ISR. Os valores das áreas dos picos cromatográficos foram comparados com valores obtidos de amostras frescas preparadas no momento da análise através do E% (erro relativo).

2.3.4.7. Seletividade

Com a finalidade de avaliar a capacidade do procedimento de preparação da amostra em eliminar interferentes, foram analisados "brancos" de microssomas de fígado de ratos sem a adição dos analítos.

2.3.5. Estudo de metabolismo *in vitro*

2.3.5.1. Equipamentos, reagentes e solventes

Para a homogeneização dos fígados dos animais foi utilizado um homogeneizador do tipo *Potter*, modelo MA 181 (Marconi, Piracicaba, Brasil). Para as centrifugações empregou-se centrífuga modelo HIMAC CF 15D2 (Hitachi, Tóquio, Japão) e ultracentrífuga Beckman XL-70 (Beckman, Carlsbad, EUA). A quantificação das proteínas nas amostras foi realizada em um espectrofotômetro SPECTRONIC 20 GENESYS™ (Spectronic instruments, Nova Iorque, EUA). As incubações foram realizadas em banho-maria com agitação, modelo MA093 (Marconi, São Paulo, Brasil).

O Hepes utilizado na preparação da solução tampão foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). NADP, glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase foram

obtidos da Sigma (St. Louis, EUA). Foram empregados ainda cloreto de potássio da Nuclear (São Paulo, SP, Brasil), ácido clorídrico da Chemco (Campinas, Brasil), glicerol e tris (base) (hidroximetil)aminometano da J.T. Baker (Phillipsburg, EUA) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) da Carlo Erba (Milão, Itália). Para a determinação de proteínas totais (PP) na fração microssomal foi utilizado o KIT da Labtest (Belo Horizonte, MG, Brasil), contendo padrão de soro-albumina bovina e solução de biureto.

2.3.5.2. Animais

Ratos machos, da espécie Wistar, pesando entre 180 a 220 g foram obtidos do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – n. 09.1.1249.53.3).

2.3.5.3. Procedimento de obtenção da fração microssomal do fígado de ratos

O procedimento de obtenção da fração microssomal de fígado de ratos foi realizado seguindo estritamente o protocolo descrito na literatura (LAKE, 1987). A Figura 2.2 mostra as principais etapas do protocolo. A concentração de proteínas na fração microssomal foi determinada empregando o método do Biureto (GORNALL et al., 1979).

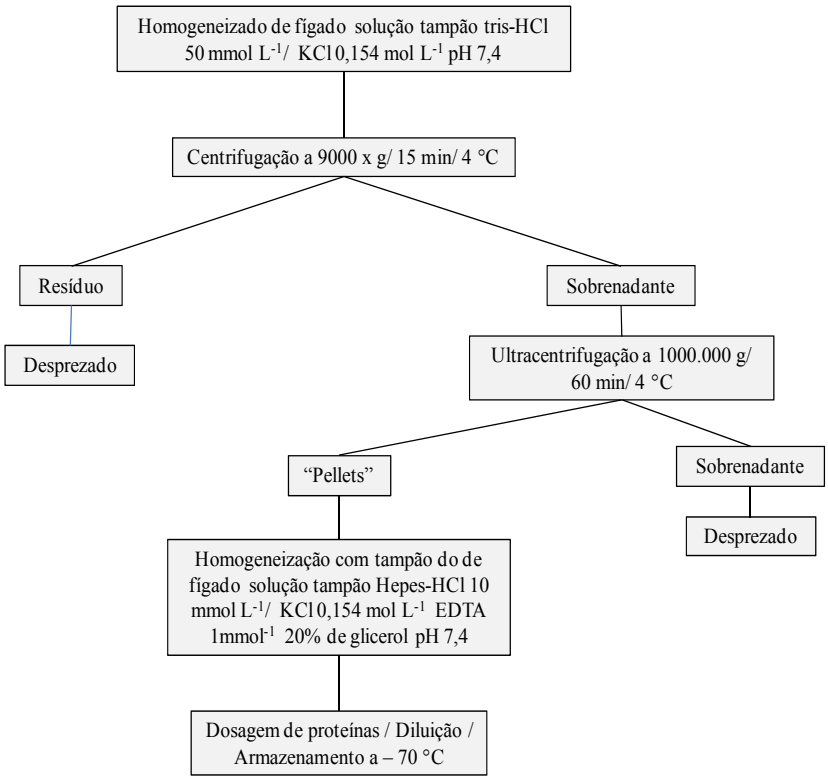


Figura 2.2 - Procedimento de isolamento dos microssomas hepáticos.

2.3.5.4. Estudo de metabolismo in vitro da ISR

O metabolismo enantiosseletivo da ISR foi avaliado pela medição da taxa de desaparecimento de cada enantiômero da ISR e a formação do PDI no meio de incubação. O sistema de incubação consistiu de 733 μL de tampão fosfato de sódio 0,5 mol L^{-1} (pH 7,4), 250 μL do sistema de regeneração NADPH (1,7 mg mL^{-1} NADP, 7,8 mg mL^{-1} de glicose-6-fosfato e 1,5 unidades mL^{-1} de glicose-6-fosfato desidrogenase em tampão Tris-HCl (50 mmol L^{-1}/KCl 0,154 mol L^{-1}, pH 7,4) e 17 μL da solução dos microssomas hepáticos de ratos. As incubações foram realizadas em triplicata (n = 3) utilizando um agitador com banho-maria a 37 ° C, por 5 min, com os microssomas hepáticos de rato reconstituídos nos mesmos tubos usados para o procedimento de HF-LPME. O metabolismo foi interrompido pela adição de 400 μL de ácido perclórico 6% e, em seguida, as amostras foram submetidas ao procedimento de microextração e analisadas por HPLC quiral. Incubações controle foram realizadas na ausência do sistema de regeneração NADPH e na ausência de microssomas de fígado de ratos.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. Separação dos enantiômeros da isradipina e do seu principal metabólito empregando fases estacionárias quirais

A separação do PDI e dos enantiômeros da ISR foi avaliada em colunas com fases estacionárias baseadas em derivados de amilose, celulose e antibiótico macrocíclico nos modos polar orgânico e normal.

2.4.1.1. Modo polar orgânico

O modo polar orgânico é caracterizado pelo uso de fases móveis constituídas por solventes orgânicos polares (acetonitrila, metanol, etanol e isopropanol), isoladamente ou em mistura. Esse modo de eluição tem sido extensivamente empregado para a resolução de compostos quirais. A maior solubilidade dos analítos nos solventes empregados em comparação às fases móveis em modo normal e reverso e o menor potencial de contaminação ambiental por causa da facilidade de tratamento dos resíduos gerados, são características que justificam a atenção voltada a este modo de eluição (MATTHIJS; MAFTOUH; HEYDEN; 2006).

As colunas Chirobiotic V (baseada no antibiótico macrocíclico vancomicina) e Chiralcel OJ-H® (baseada em derivado de celulose) foram utilizadas no modo polar orgânico, empregando metanol, 2-propanol, etanol e acetonitrila como fase móvel. Entretanto, nenhuma resolução dos enantiômeros da ISR foi observada nessas colunas, nas condições empregadas.

2.4.1.2. Modo normal

Para a análise do PDI e dos enantiômeros da ISR os melhores resultados foram alcançados utilizando o modo normal de eluição. Nesse caso, as fases móveis são constituídas por hexano e um álcool, normalmente isopropanol ou etanol.

Como estratégia para alcançar a resolução dos enantiômeros da ISR e do PDI, todas as colunas foram avaliadas com misturas contendo proporções variadas de hexano:isopropanol e hexano:etanol, partindo-se sempre da proporção 90/10 (v/v), na tentativa de verificar a possível enantiosseletividade causada pelos diferentes alcoóis. Também foi avaliada a influência da presença de pequenas quantidades de metanol no aumento da eficiência das colunas.

2.4.1.3. Condições cromatográficas otimizadas

A separação adequada, com um tempo total de análise de 11 min, foi alcançada com a coluna Chiralpak AD®, utilizando hexano:2-propanol:etanol (94/04/02, v/v/v) como fase móvel, na vazão de 1,5 mL min^{-1}. A oxibutinina foi utilizada como padrão interno (IS). Este fármaco também é um composto quiral e seus enantiômeros foram resolvidos nas condições definidas. O segundo pico eluído foi empregado para os cálculos. O primeiro pico eluído da oxibutinina coelui com o PDI mas, usando um comprimento de onda diferente para a detecção da oxibutinina, esta interferência foi eliminada. Assim, a detecção foi fixada em 325 nm para ISR e PDI e 225 nm para o IS (Figura 2.3). Sob essas condições, as resoluções entre os picos foram de 7 para PDI /(-)-(R)-ISR e 1,6 para (-)-(R)-ISR / (+)-(S)-ISR.

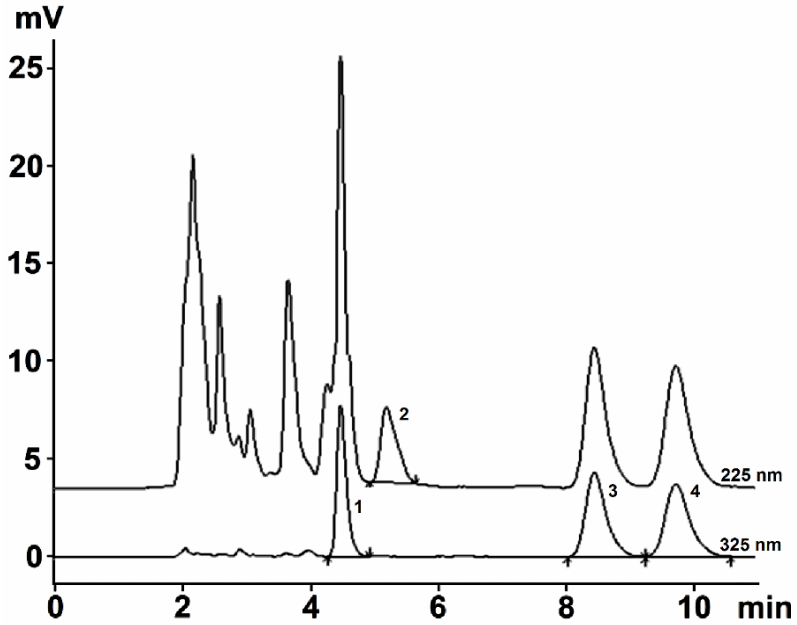


Figura 2.3 - Cromatogramas referentes a resolução do PDI, enantiômeros da ISR e IS. Meio de incubação fortificado com PDI (1), (-)-(R)-ISR (3), (+)-(S)-ISR (4) e IS (2); Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD®, hexano:2-propanol:etanol (94/04/02, v/v/v) como fase móvel, vazão de 1,5 mL min^{-1} e detecção em 325 para PDI e ISR e 225 nm para IS.

2.4.1.4. Ordem de eluição

Para estabelecer a ordem de eluição, os estereoisômeros puros (obtidos pela análise semipreparativa nas condições estabelecidas no presente trabalho) foram analisados usando o procedimento de cromatografia líquida descrito por Rask et al., (2008). Em seguida, os tempos de retenção dos enantiômeros de ambos os estudos foram comparados e a ordem de eluição foi estabelecida da seguinte forma: o primeiro pico é referente ao (-)-(R)-ISR e o segundo ao (+)-(S)-ISR.

2.4.2. Otimização do procedimento de microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca

2.4.2.1. Membrana cilíndrica oca

As membranas utilizadas em HF-LPME devem ser hidrofóbicas e compatíveis com os solventes orgânicos utilizados. As membranas de polipropileno disponíveis comercialmente (Membrana, Wuppertal, Alemanha) cumprem essas exigências (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Dentre as membranas disponíveis, a utilizada nos experimentos apresenta diâmetro interno de 600 μm, compatível com os microlitros de fase aceptora; parede com espessura de 200 μm, conferindo estabilidade mecânica durante a extração e poros com 0,2 μm de diâmetro, o que fornece eficaz micro filtração, dificultando a passagem de macromoléculas. As análises foram feitas com membranas de 10 cm de comprimento.

2.4.2.2. Solvente orgânico

A seleção de um solvente adequado é um parâmetro crítico em HF-LPME. Idealmente, o solvente orgânico deve ser compatível com a membrana, imiscível na amostra, estável e ter alto poder de solubilização dos analitos a serem extraídos (CALIXTO; BONATO, 2010). A ISR é um fármaco neutro, com logP 3,7 (SCIFINDER, 2012), portanto, a HF-LPME na configuração "duas fases" é a recomendada. Nesta configuração, o solvente orgânico impregnado nos poros da membrana é o mesmo utilizado como fase aceptora.

Quatro solventes foram avaliados quanto à capacidade de extração da ISR e do PDI: n-octanol, éter hexílico, éter butílico e acetato de hexila. De acordo com a Figura 2.4, o éter butílico foi responsável por uma porcentagem maior de recuperação para todos os analitos.

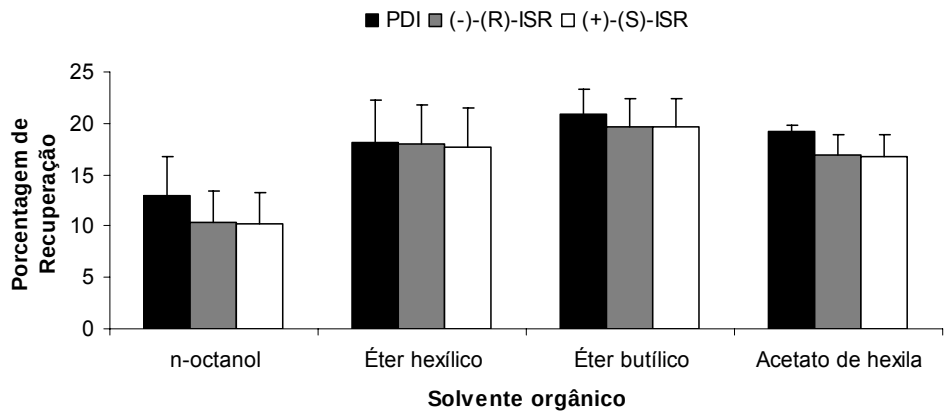


Figura 2.4 - Seleção do solvente orgânico para extração da ISR e PDI. Condições de extração (n=3): tempo de extração de 30 min, velocidade de agitação de 1000 rpm, pH da amostra ajustado para 7, membrana de 10 cm.

Entretanto, o solvente escolhido para dar prosseguimento aos experimentos com a HF-LPME foi o acetato de hexila. O éter butílico foi preterido em relação ao acetato de hexila por ter apresentado menor poder de *clean up* das amostras, interferentes da matriz coeluíram com o PDI. Além disso, experiências anteriores do nosso grupo têm mostrado que o volume de éter butílico recuperado do interior da membrana de polipropileno após extração é muito pequeno quando emprega-se altas velocidades de agitação. Em relação ao éter hexílico, apesar desse solvente demonstrar bons valores de recuperação, a sua evaporação após a extração demorou cerca de 10 horas, inviabilizando, assim, a sua utilização em análises de rotina. Com base nestas considerações, o acetato de hexila foi selecionado para os experimentos posteriores.

2.4.2.3. Tempo de extração

A extração dos analitos por HF-LPME em duas fases depende da transferência de massa do analito presente na amostra (fase aquosa) para a fase orgânica (impregnada nos poros e presente no lúmen da membrana). Este fenômeno é um processo de equilíbrio e, portanto, a recuperação do analito aumenta com o tempo de extração até atingir uma situação de platô. Neste ponto, a distribuição do analito entre as fases permanece constante (MAGALHÃES; DE OLIVEIRA; BONATO; 2009; RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Desta forma, foram avaliados cinco intervalos de tempo na tentativa de identificar o tempo necessário para o processo de extração alcançar o equilíbrio.

A Figura 2.5 mostra que há um sensível aumento dos níveis de recuperação para todos os analitos com o aumento do tempo de extração. No entanto, a partir de 30 minutos, o processo atinge o equilíbrio. Logo, o tempo de extração escolhido para dar continuidade aos experimentos de otimização da HF-LPME foi 30 minutos.

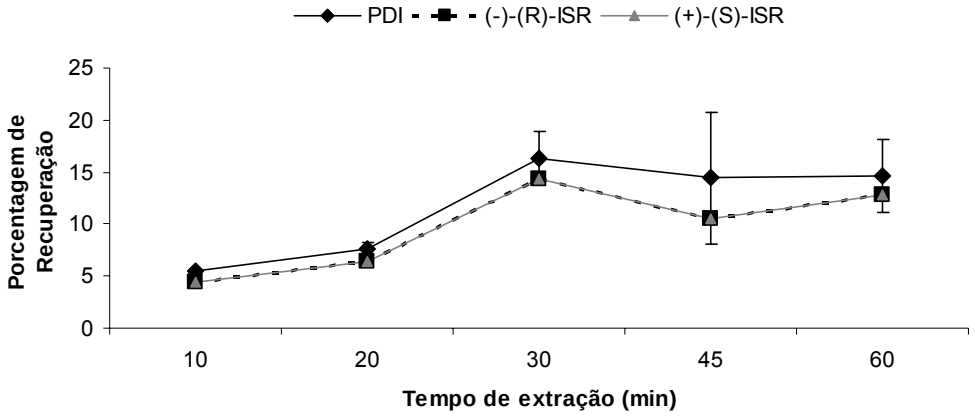


Figura 2.5 - Avaliação do tempo de extração da ISR e PDI (n=3). Condições de extração: acetato de hexila como solvente orgânico, velocidade de agitação de 1000 rpm, pH da amostra ajustado para 7, membrana de 10 cm.

2.4.2.4.Velocidade de agitação

O objetivo de agitar a amostra é acelerar a cinética de transferência dos analitos da fase doadora para o solvente orgânico, diminuindo o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio.

O efeito da agitação da amostra foi avaliado utilizando velocidades de agitação entre 500 e 1500 rpm. O aumento da velocidade de agitação melhorou a eficiência de extração da ISR e PDI (Figura 2.6). Portanto, 1500 rpm foi a velocidade de agitação selecionada dentre as avaliadas.

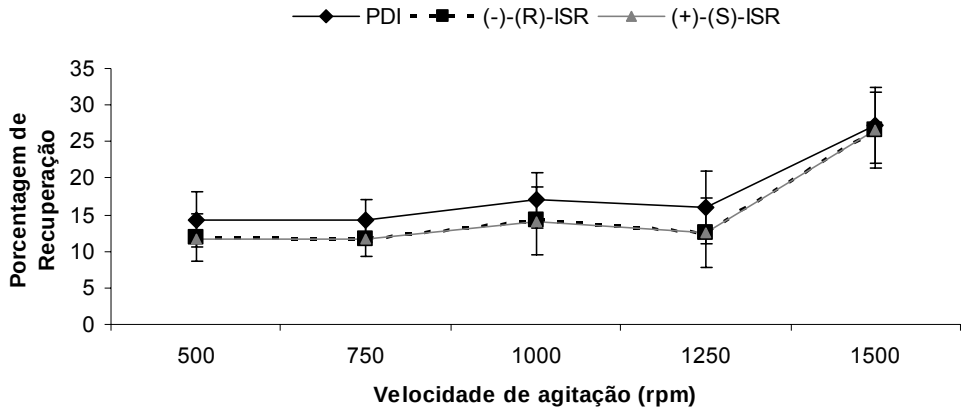


Figura 2.6 - Análise da influência da velocidade de agitação na extração da ISR e PDI (n=3). Condições de extração: acetato de hexila como solvente orgânico, tempo de extração de 30 min, pH da amostra ajustado em 7, membrana de 10 cm .

2.4.2.5. Salting-out

Dependendo da natureza dos analitos alvo, a adição de sal à amostra pode reduzir a sua solubilidade, resultando num incremento da extração por causa do efeito *salting-out*. Para avaliar este efeito, NaCl na faixa de concentração de 0-10% (m/v) foi adicionado à fase doadora. Entretanto, a adição de sal na fase doadora não alterou significativamente a recuperação obtida. Em função disso, as amostras foram preparadas sem adição de sal.

2.4.2.6. Parâmetros otimizados

Com base nos experimentos realizados, a condição otimizada de extração foi estabelecida da seguinte forma: o acetato de hexila foi usado para impreganação nos poros da membrana e como fase aceptora, 30 min de extração, agitação da amostra a 1500 rpm e 10 centímetros de comprimento da fibra.

2.4.3. Validação do método

A validação de um método é uma etapa crítica no desenvolvimento de qualquer método quantitativo. Um método analítico que produz medidas para uma determinada aplicação precisa ser "adequado à finalidade". Desta forma, é no momento da validação que é possível descobrir se o método desenvolvido é adequado para a aplicação desejada. Para validação do método desenvolvido, foram utilizados os parâmetros recomendados pela ANVISA (2003) e FDA (2001) para análise de fármacos em fluidos biológicos: seletividade, recuperação, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação (LOQ) e estabilidade dos analitos.

2.4.3.1. Linearidade e limite de quantificação

Para a avaliação da linearidade do método, a relação entre as razões das áreas dos analítos ISR e PDI pelo padrão interno *versus* as respectivas concentrações teóricas foram analisadas por regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados (Tabela 2.2). Os desvios do valor teórico (E%) de cada ponto da curva analítica ficaram dentro dos limites aceitáveis de 20% para a concentração correpondente ao limite de quantificação e 15% para as demais concentrações (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

Tabela 2.2 - Linearidade do método de análise da ISR e PDI.

Analitos	**Intervalo (ng mL^{-1})**	**Equação linear**	***r****
PDI	50 – 5000	Y = 0,0006x + 0,004	0,998
(-)-(R)-ISR	50 – 2500	Y = 0,0017x – 0,011	0,998
(+)-(S)-ISR	50 – 2500	Y = 0,0017x – 0,013	0,999

* coeficiente de correlação

O limite de quantificação foi de 50 ng mL^{-1} tanto para a ISR quanto para o PDI. Os valores de precisão (CV, %) e exatidão (E, %) dos limites de quantificação foram inferiores a 20%. Os resultados são apresentados na Tabela 2.3. Apesar de o LOQ neste método ser bem maior do que o LOQ (0,26 ng em mL^{-1}) do único método bioanalítico da literatura que faz a análise enantiosseletiva da ISR ((RASK; ANGELO; CHRISTENSEN, 1998), o presente método é muito mais rápido e possibilitou a análise simultânea do PDI, sendo, portanto, adequado à aplicação pretendida.

Tabela 2.3 - Limites de quantificação do método de análise da ISR e PDI.

Analito	**Limite de quantificação (*n*=5)[a]**		
	Concentração obtida (ng mL^{-1})	**CV[b] (%)**	**E[c] (%)**
PDI	51	7	2
(-)-(R)-ISR	55	6	10
(+)-(S)-ISR	56	4	13

[a] numero de replicatas; [b] coeficiente de variação percentual; [c] erro relativo em porcentagem.

2.4.3.2.Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas interdia e intradia utilizando amostras de meio de incubação microssomal fortificadas com três concentrações de cada enantiômero da ISR (150, 900 e 1875 ng mL^{-1}) e três concentrações do PDI (150, 1900 e 3750 ng mL^{-1}). Para todas as amostras analisadas, intradia (n = 5) e interdia (n = 3), os CV% e E% obtidos foram inferiores a 15% (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Precisão e exatidão do método de análise da ISR e PDI.

Analito	**Concentração**	**Intradia (*n*=5)[a]**		**Interdia (*n*=3)[b]**	
	Nominal (ng mL^{-1})	**CV[c] (%)**	**E[d] (%)**	**CV[c] (%)**	**E[d] (%)**
PDI	150	3	11	6	4,3
	1900	8	1	3	3,7
	3750	2	7	3	3,7
(-)-(R)-ISR	150	3	6	6	1,8
	900	6	0	3	-3
	1875	4	-4	2	-5
(+)-(S)-ISR	150	3	3	9	-2
	900	7	-1	2	-3
	1875	4	-4	2	-5

[a] numero de replicatas; [b] número de dias; [c] coeficiente de variação percentual; [d] erro relativo em porcentagem.

2.4.3.3. Recuperação

O procedimento otimizado de HF-LPME aplicado a 1 mL da fração microssomal de fígado de ratos levou a recuperações médias em torno dos 23% e 19% para o PDI e cada enantiômero ISR, respectivamente, com valores de CV% inferiores a 15% para o PDI e 5%

para cada enantiômero da ISR (Tabela 2.5). As maiores taxas de recuperação observadas para o PDI podem ser explicadas pela sua maior lipofilicidade, o que implica maior afinidade pelo solvente orgânico (fase aceptora).

Tabela 2.5 - Recuperação do método de análise da ISR e PDI.

Analito (**ng mL^{-1}**, *n* = 3)[a]	**Recuperação (%)**	**CV[b] (%)**
PDI		
150	27	14
1900	21	5
3750	22	10
Média	*23*	*15*
(-)-(R)-ISR		
150	19	13
900	19	2
1875	20	12
Média	*19*	*1*
(+)-(S)-ISR		
150	20	13
900	19	3
1875	20	12
Média	*19*	*3*

[a] numero de replicatas; [b] coeficiente de variação percentual.

Apesar dos baixos valores de recuperação obtidos para os analitos de interesse, a detectabilidade do método (LOQ = 50 ng mL-1) foi adequada para o estudo proposto (estudo de metabolismo *in vitro*). Além disso, as recuperações são coerentes com outros resultados observados com diversos outros fármacos que empregam HF-LPME na configuração de duas fases (PEDERSEN-BJERGAARD et al.; 2005).

2.4.3.4. Estabilidade

Para avaliar a estabilidade dos analitos à temperatura ambiente, as amostras foram mantidas a 25 ° C ± 2 por 12 horas, sobre a bancada. Além disso, a estabilidade dos analitos sob as condições de incubação foi analisada mantendo-os a 37 °C por 60 min em meio microssomal sem o sistema de regeneração-NADPH.

Os analitos mostraram-se estáveis nas condições estudadas, pois não foi observada diferença significativa quando as replicatas das amostras mantidas a temperatura ambiente e em condições de incubação foram comparadas com as amostras frescas, recentemente preparadas e processadas (Tabela 2.6). Os valores de E% obtidos nos estudos de estabilidade a temperatura ambiente e nas condição de incubação de PDI e ISR foram menores que 15%.

Tabela 2.6 - Estabilidade do método de análise da ISR e PDI.

Analito	**Concentrações Avaliadas (ng mL^{-1})**	**Desvio do valor nominal (E%) (Fresco)**	
		Temperatura ambiente	**Incubação**
PDI	150	5	-3
	3750	4	3
(-)-(R)-ISR	150	0	5
	1875	6	6
(+)-(S)-ISR	150	0	6
	1875	5	6

2.4.3.5. Seletividade

O método desenvolvido deve apresentar seletividade durante a quantificação do analito na presença de outras substâncias que possívelmente podem co-existir na matriz com os analitos de interesse. Fatores determinantes da seletividade são: o processo de preparação da amostra, as condições de separação (coluna e fase móvel) e o sistema de detecção.

Devido ao menor custo e maior flexibilidade operacional, a seleção e otimização do processo de preparação da amostra é, normalmente, o procedimento mais conveniente e eficaz na eliminação de interferentes. No caso específico da HF-LPME, um dos grandes benefícios desta técnica é o seu poder de *clean-up.* Amostras de branco de microssomas hepáticos foram avaliadas e, devido ao bom tratamento da amostra por HF-LPME, não apresentaram interferentes nos tempos de retenção do PDI e dos enantiômeros da ISR (Figura 2.7).

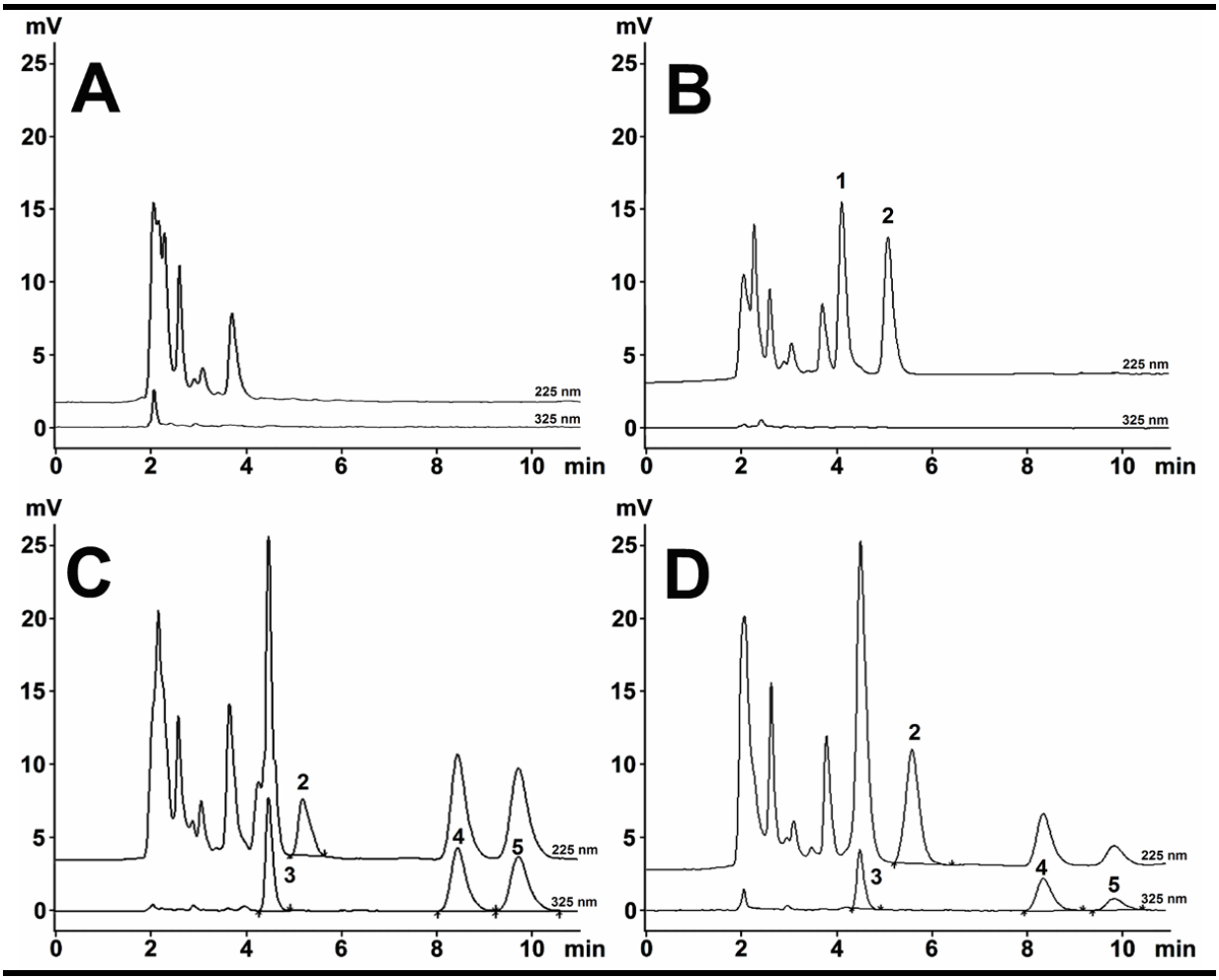


Figura 2.7 - Cromatogramas referentes à análise dos enantiômeros da ISR e do PDI após o procedimento de HF-LPME. A) Meio de incubação livre da ISR, PDI e IS; B) meio de incubação fortificado com o IS (1,2); C) meio de incubação fortificado com PDI (3), (-)-(R)-ISR (4), (+)-(S)-ISR (5) e IS (2); D) amostra obtida no estudo de metabolismo *in vitro*. Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD®, hexano:2-propanol:etanol (94/04/02, v/v/v) como fase móvel, vazão de de 1,5 mL min^{-1} e detecção em 325 para PDI e ISR e 225 nm para IS.

2.4.4. Estudo de metabolismo *in vitro* da isradipina

2.4.4.1. Otimização das condições de incubação

As condições para incubação da ISR no ensaio de metabolismo foram determinadas na faixa linear de desaparecimento de cada enantiômero da ISR e da formação do PDI, variando o tempo de incubação e a concentração de proteínas microssomais.

2.4.4.1.1. Concentração de proteínas

Foram realizadas incubações em triplicata nas seguintes concentrações de proteínas microssomais: 0, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9, 1,1, 1,3 e 1,5 mg de proteína por mL de meio de incubação. A concentração utilizada nestes experimentos foi de 1875 ng mL^{-1} para cada enantiômero da ISR. A linearidade do aparecimento do PDI e desaparecimento dos

enantiômeros da ISR foi obtida no intervalo de 0,3-0,7 mg de proteína por mL de meio de incubação, com r>0,99 para ambos os enantiômeros da ISR e também para o PDI (Figura 2.8). Assim, a concentração de proteínas de 0,5 mg mL^{-1} foi escolhida para a continuidade do estudo de metabolismo.

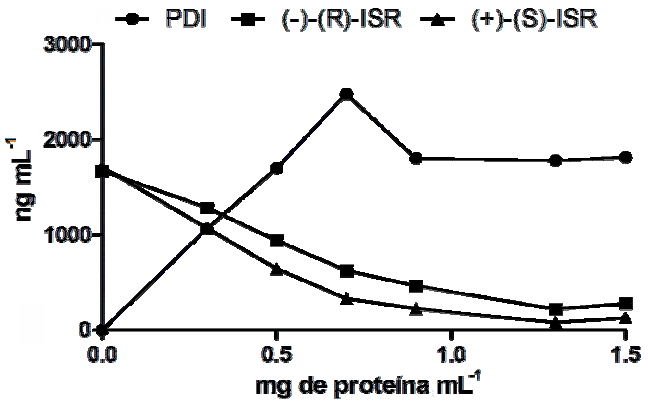


Figura 2.8 - Concentração de proteínas microssomais no meio de incubação da ISR. Condições de incubação da ISR: 15 min a 37 °C. Sistema de regeneração NADPH: $NADP^+$ (1,7 mg mL^{-1}), glicose-6-fosfato (7,8 mg mL^{-1}) e glicose-6-fosfato dehidrogenase (1,5 unidades mL^{-1}).

2.4.4.1.2. Tempo de incubação

Após definida a concentração de proteínas, os seguintes tempos de incubação foram avaliados em triplicata: 0, 1, 3, 5, 11, 17, 23, 30, 45 e 60 min. Assim como na avaliação da concentração de proteínas, a concentração utilizada da ISR foi de 1875 ng mL^{-1} para cada enantiômero. A linearidade foi obtida no intervalo de 1 a 7 min (Figura 2.9) com r> 0,99 para todos os analitos. Assim, o tempo de 5 min foi escolhido como tempo de duração do procedimento de incubação para a próxima etapa.

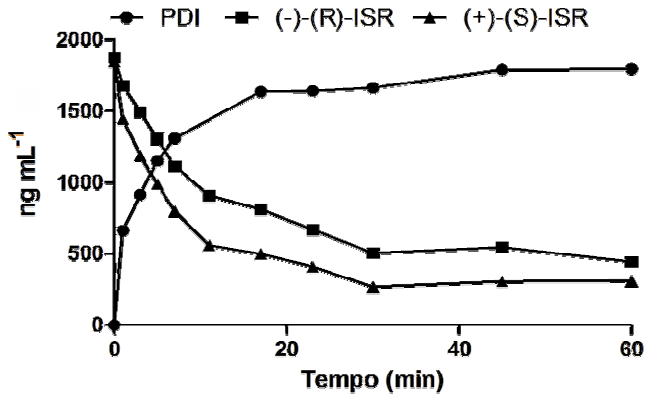


Figura 2.9 - Tempo de incubação da ISR. Condições de incubação: concentração de proteínas de 0,5 mg mL^{-1} a 37 °C. Sistema de regeneração NADPH: $NADP^+$ (1,7 mg mL^{-1}), glicose-6-fosfato (7,8 mg mL^{-1}) e glicose-6-fosfato dehidrogenase (1,5 unidades mL^{-1}).

2.4.4.1.3. Concentração do substrato

Estabelecida as condições lineares para a quantidade de proteínas microssomais (0,5 mg mL^{-1}) e determinado o tempo da etapa de incubação (5 min), o passo seguinte foi a avaliação da afinidade de cada enantiômero da ISR pelas enzimas CYP 450 microssomais. Com esta finalidade, foram determinadas as constantes de Michaelis-Menten K_m e V_{max} para cada enantiômero da ISR. Quando a concentração do substrato é suficiente para que haja saturação enzimática a velocidade da reação tende a atingir o valor máximo (V_{max}) e a concentração do substrato necessária para alcançar a metade da V_{max} é representada pelo K_m. Portanto, quanto menor o valor do K_m, maior será a afinidade dos substratos pelas enzimas (GILBERT, 2000).

A concentração do substrato (ISR) foi então variada no intervalo de 300, 450, 900, 1450, 1875 e 2500 ng mL^{-1} de cada enantiômero. As concentrações molares equivalentes são: 0,81, 1,21, 2,42, 3,90, 5,05 e 6,73 µmol L^{-1}. Os experimentos foram feitos em triplicata.

O K_m aparente e V_{max} foram calculados a partir da análise de regressão não-linear dos dados experimentais de acordo com a equação de Michaelis-Menten (Figura 2.10).

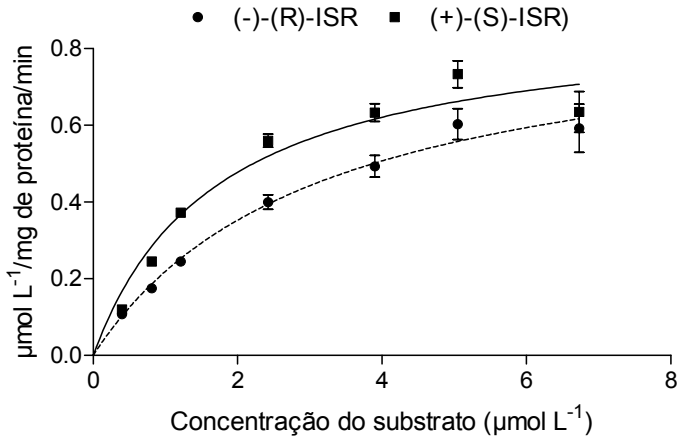


Figura 2.10 - Gráfico de Michaelis-Menten para os enantiômeros da ISR. Condições de incubação: concentração de proteínas de 0,5 mg mL^{-1} por 5 min a 37 °C. Sistema de regeneração NADPH: $NADP^+$ (1,7 mg mL^{-1}), glicose-6-fosfato (7,8 mg mL^{-1}) e glicose-6-fosfato dehidrogenase (1,5 unidades mL^{-1}).

Sob esta condição de incubação, os valores observados para (-)-(R)-ISR foram: K_m de 3,122 ± 0,62 µmol L^{-1} e V_{max} de 0,903 ± 0,08 µmol L^{-1} mg de proteínas^{-1} min^{-1}; para (+)-(S)-ISR os valores foram: K_m de 1,714 ± 0,31 µmol L^{-1} e V_{max} of 0,88 ± 0,05 µmol L^{-1} mg de proteínas^{-1} min^{-1}. Esses parâmetros cinéticos indicam pela primeira vez na literatura, maior afinidade das enzimas do citocromo P450 pelo (+)-(S)-ISR e, consequentemente, enantiosseletividade no metabolismo da ISR por microssomas de fígado de ratos, com maior metabolismo deste enantiômero.

2.5. COMENTÁRIOS FINAIS

Este capítulo descreve o emprego da HF-LPME-HPLC para a determinação enantiosseletiva dos enantiômeros da ISR e seu principal metabolito (PDI) em meio microssomal. Tanto o emprego da técnica de preparação de amostras quanto à análise e quantificação dos enantiômeros da ISR e do PDI simultaneamente são inéditos.

A HF-LPME mostrou ser uma técnica interessante para a preparação das amostras microssomais, proporcionando recuperações adequadas à aplicação proposta, eficiente *clean up*, agregado ao baixo consumo de solventes orgânicos. Além disso, o método mostrou-se muito convenientemente, uma vez que tanto a preparação das amostras (possibilidade do preparo de 36 amostras simultaneamente) quanto os estudos de metabolismo foram efetuadas nos mesmos tubos, evitando assim a introdução de passos adicionais no método analítico.

O método validado foi aplicado em estudos de metabolismo *in vitro* da ISR usando microssomas de fígado de ratos. Este estudo possibilitou determinar os valores das constantes cinéticas que revelaram um metabolismo enantiosseletivo da ISR. Assim, pela primeira vez, foi possível indicar uma enantiosseletividade no metabolismo de ISR por microssomas de fígado de ratos, com maior metabolismo do enantiômero (+)-(S)-ISR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SUWAYEH, S. A. Quick, simple, and sensitive HPLC method for determination of isradipine in plasma and its application in pharmacokinetic studies. **Analytical Letters**, v.35, p. 1205-1213, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC no. 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em; http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em 17 de fevereiro de 2012.

BARBATO, F.; QUAGLIA, F.; QUERCIA, M. T; ROTONDA, M. I. Enantioselective retention of 4-Aryl-1,4-dihydropyridine calcium-channel blockers on human serum albumin and α1- acid glycoprotein HPLC columns: relationships with different scales of lipophilicity. **Helvetica Chimica Acta**, v.83 (4), p. 767-776, 2000.

BIDOUIL, S.; DUBOIS, J.; HANOCQ, M. J., Isocratic high-performance liquid chromatographic method for the separation of isradipine and its main metabolites Application to in vitro metabolization by h3A4/OR cells. **Journal of Chromatography B**, v. 693, p. 359-366, 1997.

BOATTO, G.; NIEDDU, M.; FAEDDA, M. V.; CAPRARIIS, P. Enantiomeric separation by HPLC of 1,4-dihydropyridines with vancomycin as chiral selector. **Chirality**, v.15, p. 494-497, 2003.

CALIXTO, L. A.; BONATO, P. S. Simultaneous determination of rosiglitazone and its metabolites in rat liver microsomal fraction using hollow-fiber liquid-phase microextraction for sample preparation. **Journal of Separation Science**, v.33 p.2872-2880, 2010.

CHRISTENSEN, H. R.; ANTONSEN, K..; SIMONSEN, K..; LINDEKAER, A.; BONDE, J.; ANGELO, H. R.; KAMPMANN, J. P. Bioavailability and pharmacokinetics of isradipine after oral and intravenous administration: half-life shorter than expected? **Pharmacology & Toxicology**, v. 86, p. 178–182, 2000.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHAES, I. R. D.; DE SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Liquid-phase microextraction (LPME): Fundamentals and applications to the analysis of drugs in biological samples. **Química Nova**, v.31, p.637-644, 2008.

FDA. United States Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (2001), http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceCompliance RegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf. Acesso em 17 de fevereiro de 2012.

GILBERT, H. F**. Basic concepts in biochemistry: a student's survival guide.** McGraw-Hill, 2ª edição, New York, EUA.

GORNALL A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-66, 1949.

GUENGERICH F. P.; BRIAN W. R.; IWASAKI M.; SARI M. A.; BAEAERNHIELM C.; BERNTSSON P. Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogs by human liver cytochrome P-450 IIIA4. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 1838-1844, 1991.

HOF, R.P.; RUEGG, U.T. Pharmacology of the new calcium antagonist isradipine and its metabolites. **American Journal of Medicine**, v. 84, p. 13-17, 1988.

LAKE, B.G. (1987) In: Snell K and Mullock B (ed) **Biochemical Toxicology-A Practical Approach**, IRL Press, Oxford, Washington, DC.

MAGALHÃES, I. R. S.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S. Fundamentos e avanços recentes da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (LPME). **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 4, 2009.

MATTHIJS, N.; MAFTOUH, M.; HEYDEN, Y.V. Chiral separation strategy in polar organic solvent chromatography and performance comparison with normal-phase liquid and supercritical-fluld chromatography. **Journal of Separation Science**, v.29, p.1353-1362, 2006.

MIELCAREK, J.; Normal-Phase TLC Separation of Enantiomers of 1.4-Dihydropyridine Derivatives. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.27 (2), p. 175–179, 2001.

MIKUS, G.; MAST, V.; RATGE, D.; WISSER, H.; EICHELBAUM, M. Stereoselectivity in cardiovascular and biochemical action of calcium antagonists: studies with the enantiomers of the dihydropyridine nitrendipine. **Clinical Pharmacology & Therapeutics,** v.57(1), p:52-61, 1995.

MUELLER, C. A.; GONZÁLEZ, A. B. B.; WEINMANN, W.; Screening for dihydropyridine calcium channel blockers in plasma by automated solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometriy**, v. 39, p. 639–646, 2004.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E.; BREKKE, A.; HO T. S.; HALVORSEN, T. G. Liquid-phase microextraction of basic drugs - Selection of extraction mode based on computer calculated solubility data. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 1195-1203, 2005.

RASK, H. S.; ANGELO, H. R.; CHRISTENSEN, H. R Enantioselective determination of isradipine in human serum using chiral stationary phase liquid chromatography and gas chromatography with nitrogen selective detection. **Chirality**, v. 10, p. 808–812, 1998.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 1-10, 2004.

ROSA, M. L. D.; MADDALUNO, G.; LIONETTI, F.; PALMA, U. D.; ALBANESE, L; CARDACE, P.; BAIANO, A.; VIGORITO, C. Effects of enalapril and isradipine alone and in combination on blood pressure, renal function and echocardiographic parameters in mild hypertension. **International Journal of Cardiology**, v. 74, p. 77-84, 2000.

SCIFINDER. Versão online do SciFinder. Disponível em : https://scifinder.cas.org. Acesso em 17 de janeiro de 2012.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Pratical HPLC method development. **New York : John Wiley & Sons, Inc**., 2 ed., p. 537-610, 1997.

THADANI, U.; CHRYSANT, S.; GORWIT, J.; GILES, T.; ARCHER, S.; ITELD, B.; SINGH, S.; COPEN, D.; WAKEFORD, C.; HOBBS, S. Duration of effects of isradipine during twice daily therapy in angina pectoris. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v.8, p. 199-210, 1994.

WELCH, C. J.; SZCZERBA, T.; PERRIN, S. R. Some recent high – performance liquid chromatography separation of the enantiomers of pharmaceuticals and other compounds using the Whelk - O 1 chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v.758, p.93-98, 1997.

Capítulo 3

Análise estereosseletiva do bufuralol, 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol em meio microssomal empregando HF-LPME-HPLC.

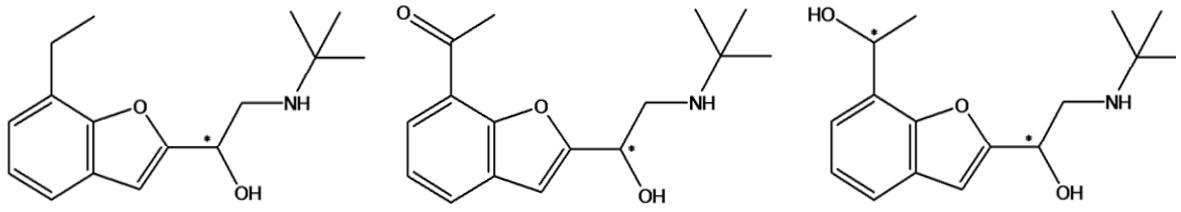
3.1. BUFURALOL

O bufuralol (BF), 1-(7-etilbezofuran-2-il)-2-tert-butilamino-1-hidroxietano, é um potente antagonista não seletivo dos receptores β-adrenérgicos. O BF é um composto quiral e o enantiômero (S)-BF tem atividade farmacológica aproximadamente 100 vezes superior a do seu isômero (R)-BF (HAMILTON; PARKES, 1977; IKEGAWA et al., 1998; NARIMATSU et al., 2002; HEFNAWY; SULTAN; AL-SHERI, 2007).

O metabolismo oxidativo do BF se dá, principalmente, pela reação de 1'-hidroxilação formando o 1'-hidroxibufuralol (1'-OH-BF). Nesse processo de hidroxilação surge um novo centro quiral, portanto o 1'-OH-BF existe na forma de quatro estereoisômeros. A oxidação adicional do 1'-OH-BF leva a formação de outro metabólito cetônico, o 1'-oxobufuralol (1'-Oxo-BF), havendo a perda do centro quiral que tinha sido criado na primeira etapa de metabolismo. A hidroxilação aromática do BF gera o 4-hidroxibufuralol (4-OH-BF) e o 6-hidroxibufuralol (6-OH-BF) (FRANCIS et al., 1982; NARIMATSU et al., 2003). O BF apresenta farmacocinética estereosseletiva. Francis et al. (1982) avaliaram a farmacocinética e a biotransformação do BF e observaram que a concentração plasmática do isômero (S) foi maior, porém o seu tempo de meia-vida foi inferior ao do isômero (R). Além disso, verificaram que a reação de hidroxilação é a rota metabólica principal para o isômero (S), enquanto que para o isômero (R), a rota principal envolve reações de conjugação.

Os principais metabólitos produzidos por biotransformação do BF, 1'-OH-BF e 1'-Oxo-BF, também são farmacologicamente ativos e a maior atividade está relacionada com a forma (S) (HAMILTON; CHAPAN, 1978; MACHIN; HURST; OSBOND, 1985). A Figura 3.1 mostra os dois principais metabólitos do BF. A biotransformação do BF em seus principais metabólitos é catalisada pela isoforma CYP2D6 da família das enzimas do

citocromo P450, sendo o BF extensivamente utilizado como marcador enzimático em estudos *in vitro* dessa isoforma (BOOBIS et al., 1985; GUT et al., 1986; YAMAZAKI et al., 1994; MANKOWSKI, 1999; BOGNI et al. 2005). Portanto, métodos analíticos, em especial aqueles que permitam a análise enantiosseletiva, são fundamentais para o aprofundamento dos estudos de metabolismo *in vitro* do próprio BF e seus metabólitos, como também em estudos onde estes compostos são marcadores de isoformas do Citocromo P450.



(A) **(B)** **(C)**

Figura 3.1 – Estruturas químicas do bufuralol (A), 1'-oxobufuralol (B) e 1'-hidroxibufuralol (C). * Centros quirais.

São poucos os métodos enantiosseletivos para a análise do BF descritos na literatura. A determinação enantiosseletiva do BF em matrizes biológicas tem sido realizada por HPLC com colunas com fases estacionárias quirais (HEFNAWY; SULTAN; AL-SHERI, 2007). Narimatsu et al. (2002) desenvolveram um método para a determinação concomitante dos enantiômeros do BF e dos estereoisômeros do 1'-OH-BF em plasma humano, utilizando a LLE para preparação das amostras e HPLC com fase estacionária quiral baseada em um derivado de polissacarídeo. Ikegawa et al. (1998) desenvolveram um método para a determinação simultânea dos enantiômeros do BF, 1'-Oxo-BF e dos estereoisômeros do 1'-OH-BF em plasma humano utilizando extração por imunoafinidade combinada com HPLC com fase estacionária quiral baseada em proteína. Entretanto, este método requer um tedioso procedimento de preparação das amostras. Um método para análise dos estereoisômeros do 1'-OH-BF foi desenvolvido por Weerawarna et al. (1991). Os pesquisadores utilizaram um laborioso método indireto empregando o (S)-(-)-1-feniletilisocianato como agente derivatizante. Todos os métodos acima utilizaram técnicas convencionais de preparo de amostras, como por exemplo a SPE, LLE e PP.

3.2. OBJETIVOS

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica estereosseletiva empregando HPLC com fases estacionárias quirais e a HF-LPME para a determinação do BF e seus metabólitos quirais, 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF, em fração microssomal de fígado de ratos. Aplicação do método desenvolvido em estudos de metabolismo *in vitro.*

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1. Soluções-padrão

O *rac*-bufuralol e seus metabólitos racêmicos, 1'-oxobufuralol e 1'-hidroxibufuralol, usados na preparação das soluções-padrão, foram obtidos da Toronto Research Chemical Inc. (North York, Canadá). O padrão interno (PI), metoprolol, foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As soluções-padrão foram preparadas em metanol grau HPLC (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA) e armazenadas na temperatura de -20 °C e protegidas da ação da luz.

3.3.2. Análise cromatográfica - Instrumentação e condições analíticas

Nas análises cromatográficas foi empregado o equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência já descrito no *item 2.3.2 (Capítulo 2).*

A resolução dos enantiômeros do BF e seus metabólitos 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF foi alcançada utilizando uma coluna Chiralcel OD-H® (150 mm × 4,6 mm, partículas de 5 µm) obtida da Chiral Technologies, Inc. (Exton, EUA). Para proteger a coluna cromatográfica foi utilizada uma coluna de guarda LiChrospher CN® (4 x 4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) constituída por partículas de sílica (5 µm) modificada com grupos cianopropil. A fase móvel constituída por hexano (contendo 60% de n-hexano, Mallinckrodt, Phillipsburg, EUA), 2-propanol (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA), metanol (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA) e dietilamina (J.T. Baker Phillipsburg, USA), na proporção de 97,5/2,0/0,5/0,5 (v/v/v/v), foi utilizada na vazão de 1,5 mL min^{-1} . A coluna foi mantida em 23 ±2 ^{o}C e a detecção foi feita em 248 nm (BF e 1'-OH-BF) e 273 nm (1'-Oxo-BF e o padrão interno).

Para determinar a ordem de eluição nessas condições, os estereoisômeros do BF, 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF foram obtidos por análise semipreparativa dos racematos por HPLC nas condições descritas acima. Os estereoisômeros do BF e do 1'-OH-BF foram então analisados na coluna Chiralcel OD® (25 x 4,6 mm, partículas de 10 µm, Chiral Technologies, Inc., Exton, EUA), usando hexano:etanol:dietilamina (95/5/0.1, v/v/v) como fase móvel, de acordo com as condições descritas por Narimatsu et al. (2002). Então, os tempos de retenção dos estereoisômeros de ambos os estudos foram comparados e a ordem de eluição estabelecida.

Por outro lado, para a determinação da ordem de eluição dos enantiômeros do 1'-Oxo-BF, os espectros de dicroísmo circular (*circular dichroism*, CD) dos enantiômeros puros do

BF e do 1'-Oxo-BF foram obtidos em um espectropolarímetro JASCO J-810 (Easton, EUA) na faixa de 190 a 400 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, a 25°C. As condições de varredura foram: 200 nm min^{-1} em modo contínuo, banda espectral de 1 nm e resposta de 0,5 s.

3.3.3. Microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca

3.3.3.1. Equipamentos, reagentes e solventes

Para a realização dos experimentos empregando HF-LPME foram utilizados os equipamentos já descritos no *item 2.3.3.1(Capítulo 2).*

Os reagentes grau P.A. empregados na preparação das soluções foram: fosfato monossódico monoidratado e fosfato dissódico diidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), hidróxido de sódio (Spectrum, New BrunswicK, EUA), ácido perclórico (Nuclear, São Paulo, Brasil) e cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha). O solvente utilizado na extração foi o n-octanol (Aldrich, Steiheim, Alemanha).

3.3.3.2. Procedimento de preparação das amostras

Para a otimização da HF-LPME empregou-se 0,5 mL do meio microssomal de fígado de ratos o qual consiste de: 360 µL de tampão fosfato de sódio 0,5 mol L^{-1} (pH 7,4), 125 µL de tampão Tris-HCl (50 mmol L^{-1}/KCl 0,154 mol L^{-1}, pH 7,4) e 25 µL de microssomas hepáticos de ratos para obter uma concentração de 1,5 mg de proteínas mL^{-1}. Um volume de 0,5 mL desta amostra biológica foi fortificado com 25 µL das soluções-padrão do BF, 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF e incubado por 15 min a 37 °C. Em seguida, 100 µL de metanol gelado e 300 µL de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} foram adicionados para encerrar as reações de metabolismo e alcalinizar a amostra até pH 13, necessário para a extração dos analitos básicos. Finalmente, o volume final de 4 mL foi ajustado utilizando água purificada no sistema Milli-Q. A membrana de polipropileno de 15 cm foi fixada nas extremidades de ponteiras plásticas e imersa em n-octanol por 10 segundos; o excesso de solvente foi removido mergulhando a membrana em um banho ultrassônico por 10 segundos. Em seguida, a membrana foi imersa na amostra e 50 µL de uma solução de ácido acético 0,2 mol L^{-1} foram introduzidos no lúmen da membrana utilizando uma microsseringa. A extração foi conduzida sob agitação de 1500 rpm por 30 min e ao final, o microextrato foi recolhido da membrana com auxílio de uma microsseringa e transferido para um tubo cônico de vidro

âmbar. O extrato foi levado à secura sob fluxo de ar comprimido, o resíduo foi dissolvido em 50 µL de fase móvel e 20 µL foram injetados no sistema cromatográfico.

3.3.4. Validação do método cromatográfico

Como no estudo de biotransformação, será avaliada apenas a formação dos metabólitos 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF, apenas eles foram incluídos no protocolo de validação.

3.3.4.1. Soluções-padrão

As soluções-padrão foram preparadas em metanol nas concentrações de 4, 12, 20, 40, 80, 160 e 200 µg mL^{-1} para o *rac*-1'-Oxo-BF e de 8, 24, 40, 60, 100, 160 e 200 µg mL^{-1} para o *rac*-1'-OH-BF. A solução do padrão interno (PI), metoprolol, foi preparada em metanol na concentração de 200 µg mL^{-1}. As soluções foram armazenadas a temperatura de -20 °C e protegidas da ação da luz.

3.3.4.2. Curva analítica e linearidade, limite de quantificação, recuperação, precisão, exatidão, estabilidade e seletividade

As curvas analíticas foram obtidas fortificando alíquotas de 0,5 mL do meio de incubação com soluções-padrão do *rac*-1'-oxo-BF, na faixa de concentração de 4-200 µg mL^{-1}, resultando em concentrações de 100-5000 ng mL^{-1} para cada enantiômero, e com soluções-padrão do *rac*-1'-OH-BF no intervalo de concentração de 8-200 µg mL^{-1}, resultando em concentrações de 100 - 2500 ng mL^{-1} para cada estereoisômero (todos os pontos foram analisados em triplicata). As amostras foram então submetidas ao procedimento de microextração (*descrito no item 3.3.3.2 deste capítulo*) e analisadas por HPLC nas condições descritas no *item 3.3.2 deste capítulo.* A melhor relação entre os pontos foi obtida através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

O limite de quantificação, a recuperação, a precisão e exatidão (intra e inter dias) e a estabilidade foram avaliados empregando o procedimento descrito no *item 2.3.4 (Capítulo 2),* utilizando alíquotas de 0,5 mL do meio microssomal. As concentrações usadas são mostradas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Concentrações empregadas na validação do método de análise dos enantiômeros do 1'-Oxo-BF e estereoisômeros do 1'-OH-BF.

Parâmetros	**Concentrações avaliadas em ng mL^{-1}**	
	Enantiômeros do 1'-Oxo-BF	**Estereoisômero do 1'-OH-BF**
Limite de quantificação *(n=5)*	100	100
Recuperação *(n=3)*	300, 2000 e 4000	300, 1250 e 2000
Precisão e exatidão *(n=5; 3 dias*)*	300, 2000 e 4000	300, 1250 e 2000
Estabilidade *(n=5)*	300 e 4000	300 e 2000

n = número de replicatas; * quantidade de dias relativos à precisão e exatidão inter dias.

A seletividade do método foi avaliada analisando "brancos" de microssomas de fígado de ratos sem a adição dos analítos e processados usando o método desenvolvido.

3.3.5. Estudo de biotransformação

3.3.5.1. Equipamentos, reagentes e solventes

Os equipamentos, reagentes e solventes utilizados no estudo de biotransformação *in vitro* são os mesmos descritos no *item 2.3.5.1 (Capítulo 2).*

3.3.5.2. Animais

Ratos machos, da espécie Wistar, pesando entre 180 a 220 g foram obtidos do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – n. 09.1.1249.53.3).

3.3.5.3. Procedimento de obtenção da fração microssomal do fígado de ratos

O procedimento de obtenção da fração microssomal do fígado de ratos é o mesmo descrito no *item 2.3.5.3 (Capítulo 2).*

3.3.5.4. Estudo da biotransformação in vitro

A biotransformação estereosseletiva do BF foi avaliada pela medida da taxa de formação dos metabólitos do BF. O sistema de incubação consistiu de 350 μL de tampão

fosfato de sódio 0,5 mol L^{-1} (pH 7,4), 125 µL do sistema de regeneração NADPH (1,7 mg mL^{-1} NADP, 7,8 mg mL^{-1} de glicose-6-fosfato e 1,5 unidades mL^{-1} de glicose-6-fosfato desidrogenase em tampão Tris-HCl (50 mmol L^{-1}/KCl 0,154 mol L^{-1}, pH 7,4) e 25 µL de microssomas hepáticos de ratos. As incubações foram realizadas em triplicata (n=3) utilizando um agitador banho-maria a 37 ° C por 45 min. A biotransformação foi interrompida pela adição de 100 µL de metanol gelado e 300 µL de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1}, em seguida, as amostras foram submetidas ao procedimento de microextração e analisadas por HPLC quiral. Incubações controle foram realizadas na ausência do sistema de regeneração NADPH e na ausência de microssomas de fígado de ratos.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Separação dos estereoisômeros do BF, 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF

A resolução dos estereoisômeros do BF e seus metabólitos havia sido previamente estudada em nosso grupo visando o desenvolvimento de um método para ser aplicado em um estudo de biotransformação empregando fungos endofíticos (BARTH; BONATO, 2012). Essas mesmas condições cromatográficas foram empregadas para o desenvolvimento do método aqui relatado.

A resolução quiral do BF, 1'-Oxo-BF, e 1'-OH-BF foi obtida utilizando a coluna Chiralcel OD-H®, no modo normal de eluição. A melhor condição de separação foi obtida com uma fase móvel composta por hexano:2-propanol:metanol (97,5/2,0/0,5 v/v/v) acrescida de 0,5% de dietilamina, na vazão de 1,5 mL min^{-1} e detecção a 248 e 273 nm. O comprimento de onda de 248 nm foi empregado para detecção dos estereoisômeros do 1'-OH-BF e o comprimento de onda de 273 nm foi usado para detecção dos enantiômeros do 1'-Oxo-BF e do padrão interno empregado, metoprolol (o primeiro pico do metoprolol foi empregado nos cálculos de quantificação). Nestas condições, a separação dos compostos foi realizada em 18 min (Figura 3.2).

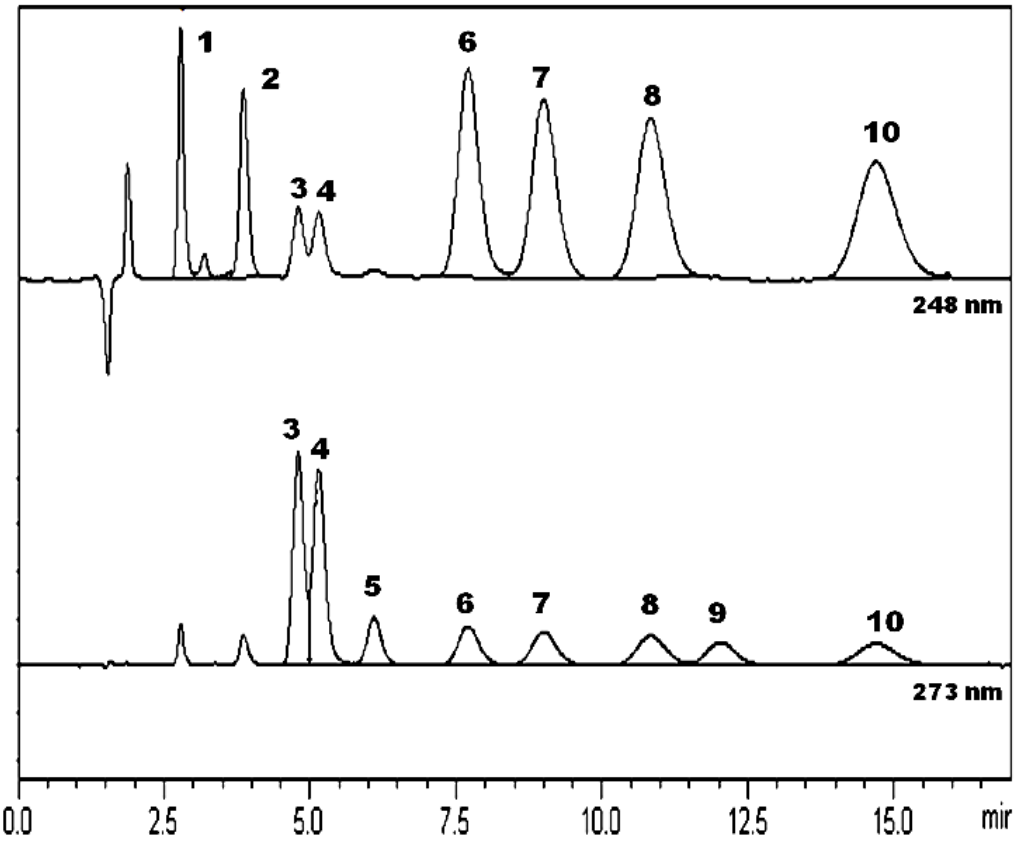


Figura 3.2 - Separação dos estereoisômeros do BF e dos seus metabólitos na coluna Chiralcel OD-H®. (R)-BF (1), (S)-BF (2), (R)-1'-Oxo-BF (3), (S)-1'-Oxo-BF (4), primeiro pico do metoprolol (IS) (5), (R,R)-1'-OH-BF (6), (S,R)-1'-OH-BF (7), (R,S)-1'-OH-BF (8), segundo pico do metoprolol (9) e (S,S)-1'-OH-BF (10). Fase móvel composta por hexano:2-propanol:metanol:dietilamina (97,5/2,0/0,5/0,5, v/v/v/v), vazão de 1,5 mL min^{-1} e detecção em 248 nm e 273 nm.

A Tabela 3.2 apresenta os parâmetros cromatográficos da separação dos estereoisômeros do BF e seus metabólitos.

Tabela 3.2 - Parâmetros de desempenho cromatográfico nas condições otimizadas para análise dos estereoisômeros do BF, 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF.

Picos	**Tempo de retenção (min)**	**Resolução**	**Fator de retenção (k)**	**Número de pratos (N)**
(R)-BF	2,7	----------	1,30	2381
(S)-BF	4,0	4,64	2,35	2596
(R)-1'-Oxo-BF	4,7	1,88	2,91	2267
(S)- 1'-Oxo-BF	5,2	1,10	3,30	2152
(R,R)-1'-OH-BF	8,0	4,82	5,66	1917
(S,R)-1'-OH-BF	9,3	1,71	6,76	2077
(R,S)-1'-OH-BF	11,3	2,25	8,45	2115
(S,S)-1'-OH-BF	15,6	3,75	12,04	2297

Obs.: todos os valores acima foram calculados pelo software LCsolution Versão 1.22SP1.

A determinação simultânea do BF e e de um de seus metabólitos (1'-OH-BF) empregando uma coluna Chiralcel OD é descrita na literatura (NARIMATSU et al., 2002). Entretanto, cada corrida cromatográfica levou 30 min.

3.4.1.1.Ordem de eluição

Para os enantiômeros do BF e para os estereoisômeros do 1'-OH-BF, a ordem de eluição foi semelhante àquela estabelecida por Narimatsu et al. (2002). Isso já era esperado pois as colunas empregadas nos dois estudos possuem o mesmo seletor quiral, diferindo apenas pelo tamanho da coluna e das partículas do suporte de sílica. A ordem de eluição dos enantiômeros do 1'-Oxo-BF foi determinada comparando os seus espectros de dicroísmo circular com os dos enantiômeros do BF. O primeiro enantiômero do 1'-Oxo-BF apresentou um efeito Cotton similar ao (R)-BF e foi considerado como sendo o (R)-1'-Oxo-BF; o segundo enantiômero do 1'-Oxo-BF mostrou efeito Cotton similar ao (S)-BF e foi considerado como sendo o (S)-1'Oxo-BF.

3.4.2. Otimização do procedimento da HF-LPME

O procedimento de HF-LPME também havia sido previamente otimizado em nosso laboratório, usando o meio de cultura Czapek como matriz (Tabela 3.3) (BARTH; BONATO, 2012). Este meio de cultura fermentativo seria utilizado no estudo de biotransformação do rac-BF empregando fungos endofíticos.

Tabela 3.3 - Composição do meio fermentativo Czapek (ALVIANO et al., 1992).

Componente	%
Sacarose	3,000
$NaNO_3$	0,200
K_2HPO_4	0,100
$MgSO_4.7\ H_2O$	0,050
KCl	0,050
$FeSO_4.7\ H_2O$	0,001
Água destilada	qsp

O pH foi ajustado para 5,0 com solução de HCl 0,1 mol L^{-1}.

As condições otimizadas para essa matriz foram:

- Solvente orgânico: n-octanol;
- Fase aceptora: ácido acético 0,2 mol L^{-1};
- pH da fase doadora: 13, ajustado pela adição de solução de NaOH;
- Tempo de extração: 30 min;
- Velocidade de agitação: 1500 rpm.

Antes de iniciar a validação do método, o procedimento de extração foi novamente avaliado com a nova matriz (meio de incubação contendo a fração microssomal de fígados de ratos). Verificou-se que as recuperações dos analitos não eram afetadas significativamente pela mudança da matriz. Portanto, as condições descritas acima foram mantidas.

3.4.3. Validação do método

O metabolismo *in vitro* do rac-BF utilizando microssomas de fígado de ratos foi avaliado pelo perfil de formação do 1'-Oxo-BF e do 1'-OH-BF e, portanto, o método foi validado apenas para estes compostos.

3.4.3.1. Recuperação e linearidade

Excelentes recuperações foram obtidas para os analitos: em torno dos 69% para os enantiômeros do 1'-Oxo-BF e 64% para os estereoisômeros do 1'-OH-BF. Os valores de CV (%) para as recuperações de todos os analitos foram inferiores a 15% (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Recuperação e linearidade do método de análise dos estereoisômeros do 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF.

Analito	**Recuperação**		**Linearidade**		
	%	**CV[a] (%)**	**Intervalo (ng mL^{-1})**	**Equação Linear**	***r*[b]**
(*R*)-1'-Oxo-BF	69	12	100 – 5000	y = 0,00089x + 0,0149	0,9978
(*S*)- 1'-Oxo-BF	69	14	100 – 5000	y = 0,00092 x+ 0,0195	0,9982
(*R,R*)-1'-OH-BF	64	13	100 – 2500	y = 0,0033x + 0,1027	0,9966
(*S,R*)-1'-OH-BF	65	11	100 – 2500	y = 0,0033x + 0,0631	0,9957
(*R,S*)-1'-OH-BF	63	14	100 – 2500	y = 0,0035x + 0,0538	0,9960
(*S,S*)-1'-OH-BF	65	12	100 – 2500	y = 0,0034x + 0,1189	0,9967

a, coeficiente de variação percentual; *r*, coeficiente de correlação.

As análises das regressões lineares foram realizadas plotando a relação entre as áreas dos picos dos analitos e do PI no eixo y *versus* as concentrações teóricas dos analitos no eixo x. O método mostrou ser linear no intervalo de concentração de 100 - 5000 ng mL^{-1} para cada enantiômero da 1'-Oxo-BF, com coeficientes de correlação r > 0,99 e no intervalo de concentração de 100 - 2500 ng mL^{-1} para cada estereoisômero de 1'-OH-BF, com coeficientes de correlação r ≥ 0,99 (Tabela 3.4). Os desvios do valor teórico (E%) de cada ponto da curva analítica ficaram dentro dos limites aceitáveis de 20% para a concentração correpondente ao limite de quantificação e 15% para as demais concentrações (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

3.4.3.2.Limite de quantificação

Os limites de quantificação (LOQs) do método validado foram de 100 ng mL^{-1} para cada enantiômero do 1'-Oxo-BF e dos estereoisômeros do 1'-OH-BF. Os valores de CV (%) e E (%) foram inferiores a 20% (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Limite de quantificação do método de análise dos estereoisômeros do 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF.

Analito	**Concentração nominal (ng mL^{-1})**	**Concentração obtida (ng mL^{-1})**	**Exatidão**	**Precisão**
			E (%)[a]	**CV (%)[b]**
(*R*)-1'-Oxo-BF	100	89	- 11	5
(*S*)- 1'-Oxo-BF	100	89	- 11	6
(*R,R*)-1'-OH-BF	100	93	- 6	13
(*S,R*)-1'-OH-BF	100	101	1	10
(*R,S*)-1'-OH-BF	100	95	-5	11
(*S,S*)-1'-OH-BF	100	91	-9	7

a, erro relativo em porcentagem; b, coeficiente de variação percentual.

3.4.3.3. Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas em ensaios realizados intradia (Tabela 3.6) e interdias (Tabela 3.7). Os valores de CV (%) e E (%) foram inferiores a 15%.

Tabela 3.6 - Precisão e exatidão intradia da análise dos estereoisômeros do 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF.

Analito	**Concentração Nominal (ng mL^{-1})**	**Intradia (*n*=5)[a]**		
		Concentração (ng mL^{-1})	**CV[b] (%)**	**E[c] (%)**
(*R*)-1'-Oxo-BF	300	342	3	14
	2000	2023	4	1
	4000	3984	3	-0
(*S*)-1'-Oxo-BF	300	336	3	12
	2000	1974	4	-1
	4000	3903	3	-2
(*R*,*R*)-1'-OH-BF	300	322	7	7
	1250	1126	6	-10
	2000	1751	3	-12
(*S*,*S*)-1'-OH-BF	300	286	12	-4
	1250	1161	6	-7
	2000	1749	4	-12
(*S*,*R*)-1'-OH-BF	300	330	9	10
	1250	1160	11	-7
	2000	1791	4	-10
(*R*,*S*)-1'-OH-BF	300	318	14	6
	1250	1142	12	-9
	2000	1826	4	-9

a, número de determinações; b, erro relativo em porcentagem; c, coeficiente de variação percentual.

Tabela 3.7 - Precisão e exatidão interdia da análise dos estereoisômeros do 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF.

Analito	**Concentração Nominal (ng mL^{-1})**	**Interdia (*n*=3)[a]**		
		Concentração (ng mL^{-1})	**CV[b] (%)**	**E[c] (%)**
(*R*)-1'-Oxo-BF	300	343	1	14
	2000	2085	3	4
	4000	4056	3	1
(*S*)-1'-Oxo-BF	300	339	1	13
	2000	2037	3	2
	4000	3973	2	-1
(*R,R*)-1'-OH-BF	300	327	2	9
	1250	1315	13	5
	2000	1859	5	-7
(*S,S*)-1'-OH-BF	300	324	5	8
	1250	1379	15	10
	2000	1926	8	-4
(*S,R*)-1'-OH-BF	300	334	3	11
	1250	1366	15	9
	2000	1898	5	-5
(*R,S*)-1'-OH-BF	300	339	5	13
	1250	1318	12	5
	2000	1944	6	-3

a, número de dias; b, erro relativo em porcentagem; c, coeficiente de variação percentual.

3.4.3.4. Estabilidade

A estabilidade dos analitos foi avaliada sobre a bancada à temperatura ambiente (25 °C ±2 por 2 horas) e nas condições de incubação (37 °C por 60 min, em meio microssomal sem o sistema de regeneração-NADPH) (Tabela 3.8).

Tabela 3.8 - Estabilidade dos estereoisômeros do 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF à temperatura ambiente e de incubação.

Analito (n=5)[a]	**Concentrações Avaliadas (ng mL^{-1})**	**Desvio do valor nominal (%) (Fresco)**	
		Temperatura ambiente	**Incubação**
(R)-1'-Oxo-BF	300	-3	-4
	4000	-2	6
(S)-1'-OxoBF	300	-1	-6
	4000	-3	4
(RR)-1'-OH-BF	300	3	4
	2000	13	12
(SS)-1'- OH-BF	300	0	-1
	2000	15	13
(SR)-1'- OH-BF	300	2	1
	2000	11	9
(RS)-1'- OH-BF	300	-2	-1
	2000	4	6

[a] número de replicatas.

Os analitos mostraram-se estáveis nas condições estudadas pois, na comparação com amostras frescas (imediatamente extraídas e analisadas após a preparação), não foram observados desvios relativos superiores a 11% (Tabela 3.8).

3.4.3.5. Seletividade

Com a finalidade de avaliar a capacidade do procedimento de preparação da amostra em eliminar interferentes, foram analisados "brancos" de microssomas de fígado de ratos sem a adição dos analítos. Após o procedimento de HF-LPME não foram detectados interferentes nos tempos de retenção dos enantiômeros do 1'-Oxo-BF e dos diasteroisômeros do 1'-OH-BF (Figura 3.3).

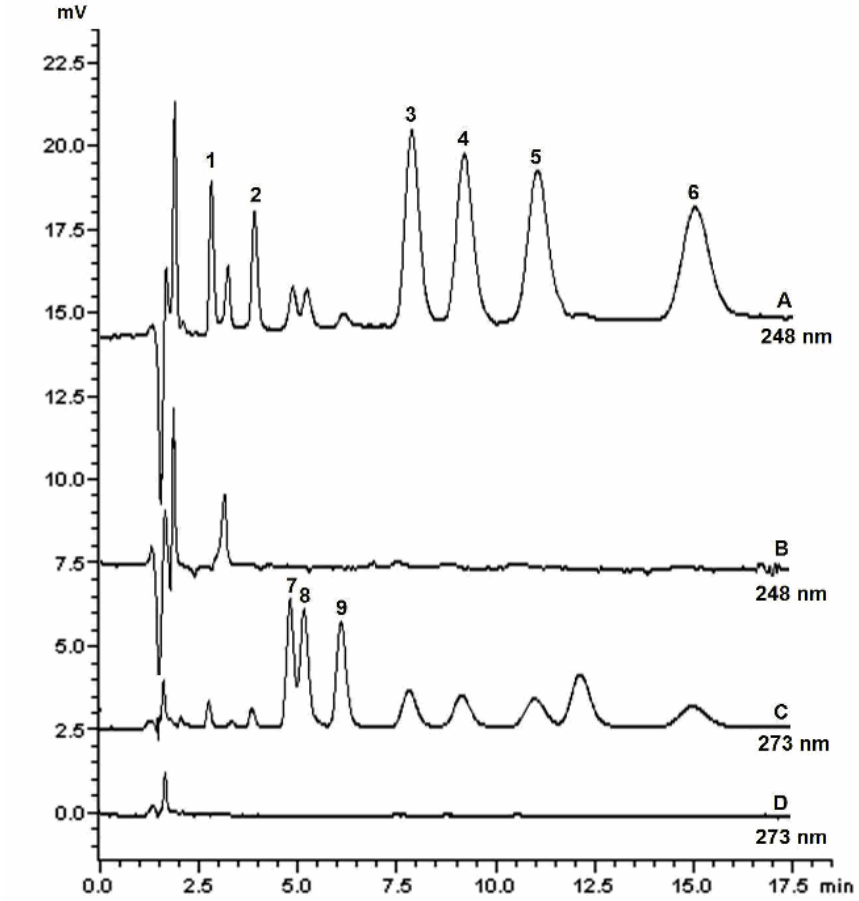


Figura 3.3 - Cromatogramas representativos dos analítos após o procedimento de HF-LPME. (B) e (D) meio de incubação livre dos analitos; (A) e (C) meio de incubação fortificado com: (R)-BF (1), (S)-BF (2), (R,R)-1'-OH-BF (3), (S,R)-1'-OH-BF (4), (R,S)-1'-OH-BF (5), (S,S)-1'-OH-BF (6), (R)-1'-Oxo-BF (7), (S)-1'-Oxo-BF (8) e IS (9). Fase móvel composta por hexano:2-propanol:metanol:dietilamina (97,5/2,0/0,5/0,5, v/v/v/v), vazão de 1,5 mL min^{-1} e detecção em 248 e 273 nm.

3.4.4. Estudo do metabolismo *in vitro* do bufuralol

3.4.4.1. Otimização das condições de incubação

As condições para incubação do *rac*-BF no estudo de metabolismo *in vitro* foram determinadas avaliando inicialmente as faixas lineares do perfil de metabolização do BF (surgimento dos metabólitos 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF), variando a concentração de proteínas

microssomais no meio de incubação e o tempo de incubação, seguindo a mesma linha metodológica do *item 2.4.4 (Capítulo 2).*

3.4.4.1.1. Concentração de proteínas

Foram realizadas incubações do *rac*-BF na concentração de 4000 ng mL^{-1} de cada enantiômero, em meio microssomal contendo as seguintes concentrações de proteínas: 0, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,5 e 2 mg de proteínas por mL de meio de incubação (n=3). Como mostrado na Figura 3.4, há um perfil de formação muito diferente entre os metabólitos. Por isso não foi possível definir um intervalo de concentração de proteínas onde a formação de todos os estereoisômeros dos metabólitos fosse linear. Então, os metabólitos (S)-1'-Oxo-BF e (R,R)-1'-OH-BF foram escolhidos para serem os determinantes da faixa linear de proteínas, pois foram os que tiveram maior taxa de formação dentre os estereoisômeros do 1'-Oxo-BF e do 1'-OH-BF, respectivamente. Assim, a linearidade da formação do (S)-1'-Oxo-BF e (R,R)-1'-OH-BF foi verificada de 0,5 a 2,0 mg mL^{-1}, com $r \geq 0,98$ para ambos os analitos. Com o intuito de favorecer a maior formação dos metabólitos do *rac*-BF, em especial a concentração de proteínas microssomais de 1,5 mg mL^{-1} foi escolhida para os futuros passos do estudo.

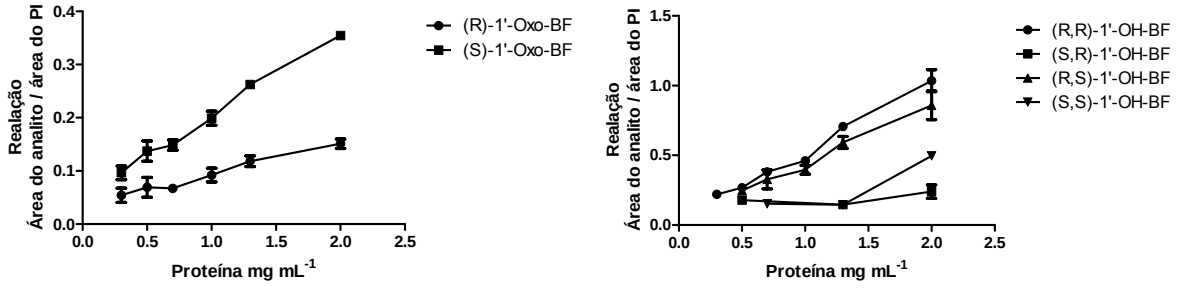


Figura 3.4 - Variação da concentração de proteínas microssomais no meio de incubação do BF. Condições de incubação do rac-BF: 30 min a 37 °C. Sistema de regeneração NADPH: $NADP^+$ (1,7 mg mL^{-1}), glicose-6-fosfato (7,8 mg mL^{-1}) e glicose-6-fosfato dehidrogenase (1,5 unidades mL^{-1}).

3.4.4.1.2. Tempo de incubação

Após a definição da concentração de proteínas microssomais, o passo seguinte foi a avaliação da influência do tempo no perfil metabólico do *rac*-BF. Para este fim, os seguintes tempos de incubação foram avaliados em triplicata: 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 min. Assim como na avaliação da concentração de proteínas, a concentração utilizada do *rac*-BF foi de 4000 ng mL^{-1} para cada enantiômero.

O perfil metabólico mostra que com tempos muito longos, as concentrações dos metabólitos (R,R)-1'-OH-BF, (R,S)-1'-OH-BF e o (S)-1'-Oxo-BF começa a diminuir, o que

pode ser uma indicação da metabolização desses metabólitos em outras espécies que não estão sendo monitoradas.

Como na avaliação da concentração de proteínas, não foi possível definir uma mesma faixa linear de tempo de incubação para a formação de todos os metabólitos. Assim, a linearidade foi obtida no intervalo de 20 a 60 min (Figura 3.5), com r> 0,98para (S)-1'-Oxo-BF e (R,R)-1'-OH-BF.

Assim, o tempo de 45 min foi escolhido como duração do procedimento de incubação para a próxima etapa.

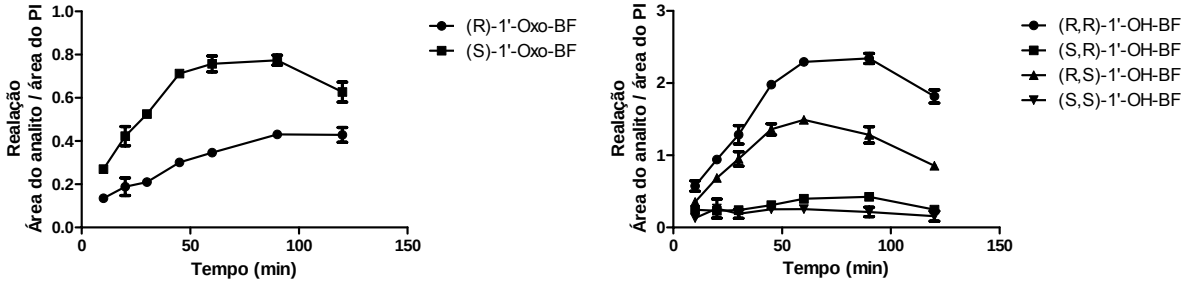


Figura 3.5 – Variação do tempo de incubação do BF. Condições de incubação do rac-BF: concentração de proteínas de 1,5 mg mL^{-1} a 37 °C. Sistema de regeneração NADPH: $NADP^+$ (1,7 mg mL^{-1}), glicose-6-fosfato (7,8 mg mL^{-1}) e glicose-6-fosfato dehidrogenase (1,5 unidades mL^{-1}).

3.4.4.1.3. Concentração do substrato

Após os dois passos anteriores, as condições estabelecidas foram 45 min de incubação e 1,5 mg mL^{-1} de proteínas. Utilizando essas condições, a etapa seguinte foi avaliar a influência da variação da concentração do *rac*-BF (substrato) na velocidade de formação dos seus principais metabólitos 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF. O intervalo de concentração do *rac*-BF avaliado foi de 1000 ng mL^{-1} a 10000 ng mL^{-1}. A Figura 3.6 mostra a formação dos enantiômeros do 1'-Oxo-BF e estereoisômeros 1'-OH-BF em resposta ao aumento da concentração de *rac*-BF.

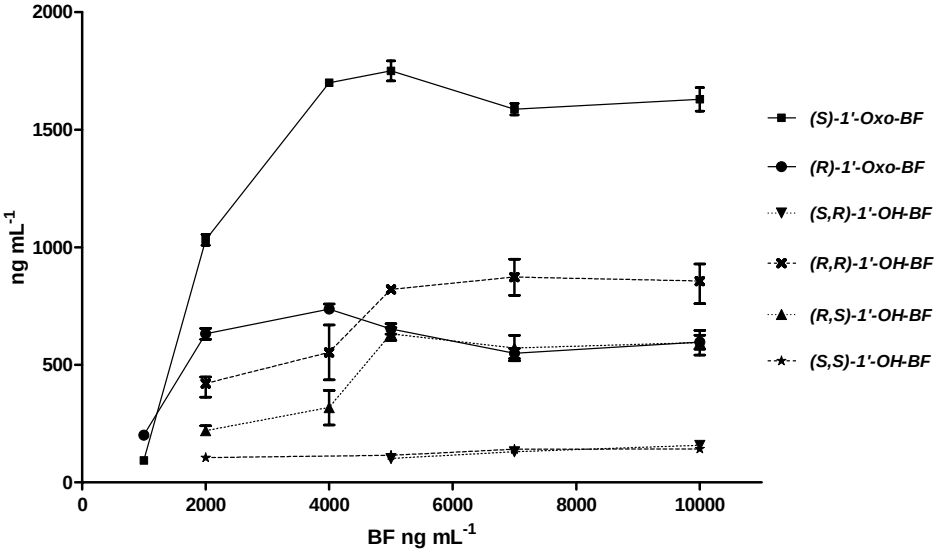


Figura 3.6 – Influência da concentração do BF na formação dos metabólitos. Condições de incubação: concentração de proteínas de 1,5 mg mL^{-1} por 5 min a 37 °C. Sistema de regeneração NADPH: $NADP^+$ (1,7 mg mL^{-1}), glicose-6-fosfato (7,8 mg mL^{-1}) e glicose-6-fosfato dehidrogenase (1,5 unidades mL^{-1}).

O estudo de biotransformação *in vitro* do *rac*-BF usando microssomas de fígado de ratos mostrou formação predominante de (S)-1'-oxo-BF, (R,R) -1'-OH-BF e (R,S) -1'-OH-BF. Estes dados estão de acordo com Weerawarna et al. (1991) e Narimatsu et al. (2003).

3.5. COMENTÁRIOS FINAIS

Neste capítulo, referente ao fármaco básico BF, foram apresentados os resultados obtidos durante a otimização da metodologia de análise dos estereoisômeros dos principais metabólitos do BF, o 1'-Oxo-BF e o 1'-OH-BF. A melhor resolução do BF e seus metabólitos foi obtida na coluna Chiralcel OD-H em modo normal de eluição. Pela primeira vez, os dois enantiômeros do 1'-Oxo-BF e os 4 diasteroisômeros do 1'-OH-BF foram resolvidos e quantificados numa mesma corrida cromatográfica, tornando esta metodologia muito útil para estudos futuros de metabolismo do BF.

A utilização da HF-LPME como técnica de preparação das amostras mostrou-se adequada para a finalidade proposta. A HF-LPME executada no modo 3-fases, teve o n-octanol como o solvente mais adequado para impregnação dos poros da membrana e o ácido acético fazendo às vezes da fase aceptora. Também foi observado que a forte alcalinização da fase doadora gerou os melhores resultados. Os valores de recuperação para todos os analitos foram excelentes, acima dos 60%.

O método estereosseletivo desenvolvido e validado segundo normas de órgão regulamentadores como a ANVISA e o FDA foi aplicado em um estudo de metabolismo *in vitro* usando microssomas de fígado de ratos. O estudo permitiu a avaliação do perfil metabólico estereosseletivo do BF, revelando uma preferência pela formação do (S) -1'-Oxo-BF, do (R,R) -1'-OH-BF e do (R,S) -1'-OH-BF.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC no. 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em; http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em 17 de fevereiro de 2012.

ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R. TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER, J.; SOUZA, W. Effect of environment factors on Fonsecae pedrosoi morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. **Mycopathologia**, v. 119, p. 17-23, 1992.

BARTH, T.; BONATO, P. S. Análise estereosseletiva de bufuralol, donepezila, midodrina e seus metabólitos e aplicações em estudos de biotransformações com fungos. 2012. Tese (Doutorado em Ciências, Área de concentração: Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

BOGNI, A.; MONSHOUWER, M.; MOSCONE, A.; HIDESTRAND, M.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; HARTUNG, T.; COECKE, S. Substrate specific metabolism by polymorphic cytochrome P450 2D6 alleles. **Toxicology *In Vitro***, v. 19, p. 621-629, 2005.

BOOBIS, A. R.; MURRAY, S.; HAMPDEN, C. E.; DAVIES, D. S. Genetic polymorphism in drug oxidation: *In vitro* studies of human debrisoquine 4-hydroxylase and bufuralol 1′-hydroxylase activities. **Biochemical Pharmacology**. v. 34, p. 65-71, 1985.

FDA. United States Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (2001), http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceCompliance RegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf. Acesso em 17 de fevereiro de 2012.

FRANCIS, R. J.; EAST, P. B.; LARMAN, J. Kinetics and Metabolism of (+)-, (-)- and (±)-bufuralol. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 23, p. 529-533, 1982.

GUT, T. J.; CATIN, T.; DAYER, P.; KROMBACH, T.; ZANGER, U.; MEYER, U. A. Debrisoquine sparteine-type polymorphism of drug oxidation - purification and characterization of 2 functionally different human-liver cytochrome-p-450 isozymes involved in impaired hydroxylation of the prototype substrate bufuralol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 1734-1743, 1986.

HAMILTON, T. C.; CHAPMAN, V.; Intrinsic sympathomimetic activity of beta-adrenoceptor blocking drugs at cardiac and vascular beta-adrenoceptors. **Life Sciences**, v. 23, p. 813-819, 1978.

HAMILTON, T.C.; PARKES, M.W. Bufuralol, a new β adrenoceptor blocking agent in a series of benzofuran 2 ethanolamines. II. Pharmacology. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 27, p. 1410–1417, 1977.

HEFNAWY, M. M.; SULTAN, M. A.; AL-SHERI, M. M. HPLC separation technique for analysis of bufuralol enantiomers in plasma and pharmaceutical formulations using a vancomycin chiral stationary phase and UV detection. **Journal of Chromatography B**, v. 856, p. 328-336, 2007.

IKEGAWA, S.; MATSUURA, K.; SATO, T.; ISRIYANTHI, N. M. R.; NIWA, T.; MIYAIRI, S.; TAKASHINA, H.; KAWASHIMA, Y.; GOTO, J. Enantioselective immunoaffinity extraction for simultaneous determination of optically active bufuralol and its metabolites in human plasma by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 1-9, 1998.

MACHIN, P. J.; HURST, D. N.; OSBOND, J. M. β-Adrenoceptor activity of the stereoisomers of bufuralol alcohol and ketone metabolites. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 1648-1651, 1985.

MANKOWSKI, D. C. The role of CYP2C19 in the metabolism of (plus /-) bufuralol, the prototypic substrate of CYP2D6. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, p. 1024-1028, 1999.

NARIMATSU, S.; TAKEMI, C.; KURAMOTO, S.; TSUZUKI, D.; HICHIYA, H.; TAMAGAKE, K.; YAMAMOTO, S. Stereoselectivity in the oxidation of bufuralol, a chiral substrate, by human cytochrome P450. **Chirality**, v. 15, p. 333-339, 2003.

NARIMATSU, S.; TAKEMI, C.; TSUZUKI, D.; KATAOKA, H.; YAMAMOTO, S.; SHIMADA, N.; SUZUKI, S.; SATOH, T.; MEYER, U. A.; GONZALEZ, F. J. Stereoselective metabolism of bufuralol racemate and enantiomers in human liver microsomes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 1, p. 172-178, 2002.

WEERAWARNA, S. A.; GEISSHUSLER, S. M.; MURTHY, S. S.; NELSON, W. L. Enantioselective and diastereoselective hydroxylation of bufuralol. Absolute conFiguration of the 7-(1-hydroxyethyl)-2-(1-hydroxy-2-(tert-butylamino)ethyl)benzofurans, the benzylic hydroxylation metabolite. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 3091–3097, 1991.

YAMAZAKI, H.; GUO, Z.; PERSMARK, M.; MIMURA, M.; INOUE, K.; GUENGERICH, F. P.; SHIMADA, T. Bufuralol hydroxylation by cytochrome-p450 2D6 and 1A2 enzymes in human liver-microsomes. **Molecular Pharmacology**, v. 46, p. 568-577, 1994.

Capítulo 4

Análise enantiosseletiva da ranolazina e desmetil ranolazina em meio microssomal utilizando DLLME-LC-MS-MS.

4.1. RANOLAZINA

A ranolazina (RNZ, Figura 4,1)) é o primeiro representante aprovado de uma nova classe de fármacos contra angina crônica estável em quase 30 anos. O fármaco foi originalmente patenteado em 1989 mas só teve seu uso aprovado pelo FDA em 2006 (SAJID; DAVID, 2010; BHAUMIK et al., 2008). Angina crônica estável descreve o quadro clínico de pacientes que ainda têm sintomas de angina e evidência objetiva de isquemia, apesar do melhor tratamento farmacológico. A ranolazina está disponível em comprimido revestido de liberação controlada na dose de 500 mg (NASH; NASH, 2008).

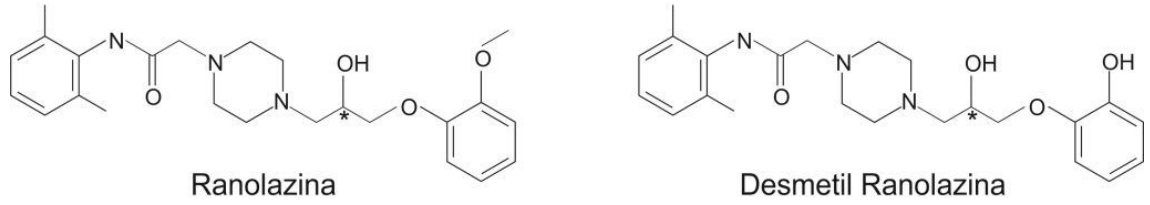


Figura 4.1 - Estruturas químicas da ranolazina e desmetil ranolazina. *centro quiral.

A RNZ é um inibidor selectivo da corrente tardia de sódio trans-celular, diminuindo diretamente sobrecargas de sódio intracelular e indiretamente prevenindo sobrecargas de cálcio (devido aos canais de cálcio dependentes de sódio), fato comum em quadros isquêmicos (HALE; KLONER, 2006; HASENFUSS; MAIER, 2008; FRASER et al., 2006).

A RNZ é comercializada como racemato, mesma proporção entre os enantiômeros (+)(R)-RNZ e (-)-(S)-RNZ. Estudos que abordam uma possível enantiosseletividade na farmacocinética e farmacodinâmica deste fármaco ainda são insipientes. Somente o estudo descrito por Jerling, 2006, mostra que a disposição cinética desse fármaco em 11 voluntários sadios não é

estereosseletiva (JERLING, 2006). Com relação ao metabolismo e eliminação (ambos sem abordagem enantiosseletiva), estudos mostram que a RNZ é biotransformada principalmente pela enzima CYP3A4 e secundariamente pela enzima CYP2D6, ambas isoformas do sistema citocromo P450, sendo que somente 5 a 10% da dose é excretada na forma inalterada na urina (JERLING, 2006). Segundo Jerling (2006), a hidroxilação, N-dealquilação e a O-desmetilação fazem parte da via metabólica da ranolazina (JERLING, 2006). Entretanto, este estudo é confuso e não mostra detalhes experimentais importantes, como por exemplo: qual modelo específico de avaliação do metabolismo foi utilizado, dados estatísticos, ferramentas de identificação dos metabólitos, entre outros. Sendo assim, estudos mais específicos abordando o metabolismo da RNZ devem ser conduzidos, incluindo estudos enantiosseletivos.

A RNZ apresenta pouca absorção na faixa UV, portanto métodos cromatográficos que utilizam detectores UV não apresentam detectabilidade suficiente para a determinação da RNZ em matrizes biológicas (LIANG et al., 2006). Mesmo assim, o trabalho desenvolvido por Luo et al. (2006) tem importância histórica pois demonstra a possibilidade de separar os enantiômeros da RNZ empregando colunas quirais baseadas em tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, em modo normal e polar orgânico. O método desenvolvido tem potencial semipreparativo mas não apresenta detectabilidade suficiente (alto limite de quantificação, 2,9 µg mL^{-1}) para aplicações bioanalíticas (LUO et al., 2006).

Herron et al. (1995) desenvolveram um método empregando LC-MS e SPE para a quantificação da RNZ e onze metabólitos em plasma humano. Entretanto, o método não passou pelo processo de validação, além do trabalho publicado ser pouco claro na descrição metodológica do método analítico (HERRON; EADIE; PENMAN, 1995). Em 2006 foram publicados dois trabalhos objetivando a quantificação da RNZ em plasma de ratos (LIANG et al., 2006; ZHONG et al., 2006). Ambos os métodos foram validados e empregaram LLE na preparação da amostra, coluna cromatográfica C18 com eluição isocrática no modo reverso e detecção utilizando um espectrômetro de massas mono quadrupolo. A principal diferença entre os métodos reside na técnica de ionização dos analitos na interface entre o cromatógrafo e o espectrômetro de massas. Liang et al. (2006) empregaram a ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS) e Zhong et al. (2006) empregaram a ionização por eletronebulização (LC-ESI-MS). O limite de quantificação foi de 20 ng mL^{-1} para ambos os métodos. Mais recentemente, Bhaumik et al. (2008) apresentaram um método validado para a quantificação da RNZ em plasma humano e aplicação em um estudo de bioequivalência utilizando LC-ESI-MS-MS. O método emprega a precipitação de proteínas como técnica de preparo de amostra e resultou em limite de quantificação de 5 ng mL^{-1}. Entretanto, é importante ressaltar que todos esses métodos bioanalíticos citados não são enantiosseletivos.

4.2. OBJETIVOS

Desenvolvimento e validação de um método analítico empregando a DLLME e LC-MS-MS para a determinação enantiosseletiva da RNZ e DRNZ em fração microssomal de fígado de ratos. Aplicação do método desenvolvido em estudos de metabolismo *in vitro.*

4.3. MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1. Soluções-padrão

A *rac*-RNZ e *rac*-DRNZ, usadas na preparação das soluções-padrão, foram obtidas da Toronto Research Chemical Inc. (North York, Canadá). As soluções-padrão foram preparadas em metanol grau HPLC (Mallinckrodt, Phillipsburg, EUA) e armazenadas na temperatura de -20 °C, protegidas da ação da luz.

4.3.2. Análise cromatográfica - Instrumentação e condições analíticas

As análises e validação do método foram conduzidas utilizando um cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por uma bomba modelo LC10AD, forno modelo CTO-10 AS e injetor Rheodyne modelo 7125 (Cotati, EUA) com amostrador de 20 µL. A resolução dos enantiômeros foi avaliada empregando uma coluna Chiralcel OD-H® (150 x 4.6 mm, partículas de 5 µm, Chiral Technologies, Exton, EUA) e empregando a fase móvel composta por 60% de hexano (60% de n-hexano, Mallinckrodt, Phillipsburg, EUA), 40 % de etanol (J. T. Baker, Phillipsburg, EUA) e 0,05% de dietilamina (v/v/v) na vazão de 1,0 mL min^{-1}.

Uma coluna guarda C18 (4,6 x 10 mm, partículas de 5 µm, Merck, Darmstadt, Alemanha) foi obtida quando da análise de amostras biológicas, visando à proteção da coluna cromatográfica quiral.

O sistema de detecção por MS utilizado foi o Quattro LC triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com uma interface ESI. As análises foram executadas no modo positivo. O efluente da coluna foi dividido por uma válvula do tipo T (Upchurch Scientific, Oak Harbor, EUA) e apenas um fluxo de 0,1 mL min^{-1} foi transferido para o MS. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 100 e 250°C, respectivamente. Nitrogênio e argônio foram utilizados como gás de secagem/nebulização e colisão, respectivamente. A aquisição dos dados foi feita através do programa MassLynx, versão 3.5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

As condições ótimas do MS-MS foram obtidas usando soluções-padrão da *rac*-RNZ e *rac*-DRNZ (50 µg mL^{-1}) preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão na vazão de 10 µL min^{-1}. As análises foram executadas no modo SRM (*Single Reaction Monitoring*). A transição *m/z* 428>279 (voltagem do cone de 40 V e energia de colisão de 25 eV) foi monitorada para os enantiômeros da RNZ, enquanto que, para enantiômeros da

DRNZ, a transição monitorada foi *m/z* 414>266 (voltagem do cone de 39 V e energia de colisão de 23 eV).

4.3.3. Microextração líquido-líquido dispersiva

4.3.3.1. Reagentes e solventes

Os SE avaliados nos testes de otimização da DLLME foram: diclorometano e clorofórmio, ambos grau HPLC e obtidos da Sigma (St. Louis, EUA), 1,1-dicloroetano grau HPLC obtido da Fluka (Buchs, Suiça) e tetracloreto de carbono grau P.A. obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os SD avaliados foram: acetona, metanol, etanol e acetonitrila, todos grau HPLC e obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Fosfato de sódio dibásico grau P.A. empregado na preparação das soluções tampão foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.3.3.2. Composição média da matriz microssomal

Para a otimização da DLLME empregou-se 0,5 mL do meio microssomal de fígado de ratos o qual consiste de: tampão fosfato de sódio 0,35 mol L^{-1} (pH 7,4), 125 µL de tampão Tris-HCl (12,5 mmol L^{-1}/KCl 0,04 mol L^{-1}, pH 7,4) e microssomas hepáticos de ratos na concentração de 1 mg de proteínas mL^{-1}. Esses reagentes, todos grau P.A. foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.3.3.3. Procedimento geral da otimização da extração por DLLME

Para o processo de otimização da DLLME, 0,5 mL da matriz microssomal fortificada com a *rac*-RNZ e a *rac*-DRNZ (concentrações finais de aproximadamente 1 µg mL^{-1} de cada enantiômero) foram adicionados a um tubo de vidro cônico. Em seguida, adicionou-se volume de água suficiente para alcançar o volume final de 1, 2, 4 ou 6 mL e, imediatamente, a mistura SD/SE foi injetada na amostra com posterior centrifugação (HIMAC CF 15D2, Hitachi, Tóquio, Japão) a 4000 rpm por 3, 5, 10 ou 20 min. Nos testes onde o ajuste do pH foi necessário, a água foi substituída por 1,5 mL de tampão fosfato de sódio na concentração de 0,5 mol L^{-1} e pH 8 ou 9. Ao final da centrifugação, a fase sedimentada foi transferida para outro tubo cônico com o auxílio de uma microseringa e o extrato foi levado a secura sob fluxo de ar comprimido; em seguida, o resíduo foi dissolvido em 50 µL de fase móvel e 20 µL foram injetados no sistema cromatográfico. As extrações foram feitas sempre em triplicatas.

4.3.4. Validação do método cromatográfico

4.3.4.1. Soluções-padrão

As soluções-padrão foram preparadas em metanol nas concentrações de 0,4, 1,2, 8, 20, 30 e 40 µg mL^{-1} para *rac*-DRNZ e 1, 3, 10, 30, 75 e 100 µg mL^{-1} para *rac*-RNZ. As soluções foram armazenadas a temperatura de -20 °C e protegidas da ação da luz.

4.3.4.2. Curva analítica e linearidade, limite de quantificação, recuperação, precisão e exatidão, estabilidade e seletividade

Para preparação das curvas analíticas e avaliação da linearidade, alíquotas de 0,5 mL do meio de incubação (*descrito no item 4.3.3.2 deste capítulo*) foram fortificadas com 25 µL das soluções-padrão da *rac*-RNZ e *rac*-DRNZ. Obteve-se assim concentrações finais no meio microssomal de 10, 30, 200, 500, 750 e 1000 ng mL^{-1} para cada enantiômero da DRNZ e 25, 75, 250, 750, 1875 e 2500 ng mL^{-1} de cada enantiômero da RNZ (todos os pontos foram analisados em triplicata). As amostras foram então submetidas ao procedimento de microextração e analisadas por LC-MS-MS. A melhor relação entre os pontos foi obtida através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e ponderada por $1/x^2$.

Os demais parâmetros da validação foram obtidos utilizando o mesmo procedimento descrito no *item 2.3.4 (Capítulo 2)*. As concentrações empregadas na avaliação desses parâmetros são mostradas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Parâmetros da validação do método de análise da RNZ e DRNZ.

	Concentrações avaliadas em ng mL^{-1} (para cada enantiômero)	
	RNZ	**DRNZ**
Limite de quantificação *(n=5)*	25	10
Recuperação *(n=3)*	75, 750 e 1875	30, 500 e 750
Precisão e exatidão *(n=5; 3 dias*)*	75, 750 e 1875	30, 500 e 750
Estabilidade *(n=6)*	75 e 1875	30 e 750

n número de replicatas; * quantidade de dias referentes à precisão e exatidão interdias.

Finalmente, com a finalidade de avaliar a capacidade do procedimento de preparação da amostra em eliminar interferentes, foram analisados "brancos" de microssomas de fígado de ratos sem a adição dos analítos.

4.3.4.3. Efeito da matriz na ionização dos analitos

Além da avaliação da linearidade e dos parâmetros relacionados na Tabela 4.1, métodos que empregam a detecção por MS requerem também a avaliação do efeito da matriz na ionização dos analitos na fonte ESI. Para tanto, 5 amostras "branco" (todos os componentes da amostra com exceção dos analitos de interesse) foram submetidas ao procedimento de extração e os extratos obtidos foram então fortificados com os analitos na concentração de 75 e 30 ng mL^{-1} para cada enantiômero da RNZ e DRNZ, respectivamente. Os extratos foram levados a secura sob fluxo de ar comprimido e os resíduos foram então reconstituídos na fase móvel e injetados no cromatógrafo. As respostas destas 5 replicatas foram comparadas com 5 amostras dos padrões preparados na fase móvel, nas mesmas concentrações.

4.3.5. Estudo de metabolismo

4.3.5.1. Equipamentos, reagentes e solventes

Um homogeneizador do tipo *Potter*, modelo MA 181 (Marconi, Piracicaba, Brasil) foi utilizado para a homogeneização dos fígados dos animais. Para as centrifugações empregou-se centrífuga modelo HIMAC CF 15D2 (Hitachi, Tóquio, Japão) e ultracentrífuga Beckman XL-70 (Beckman, Carlsbad, EUA). A quantificação das proteínas nas amostras foi realizada em um espectrofotômetro SPECTRONIC 20 GENESYS™ (Spectronic instruments, Nova Iorque, EUA). As incubações foram realizadas em banho-maria com agitação modelo MA093 (Marconi, Piracicaba, Brasil).

O Hepes utilizado na preparação da solução tampão foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). NADP, glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase foram obtidos da Sigma (St. Louis, EUA). Cloreto de potássio da Nuclear (São Paulo, SP, Brasil), ácido clorídrico da Chemco (Campinas, Brasil), glicerol e tris (base) (hidroximetil)aminometano da J.T. Baker (Phillipsburg, EUA) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) da Carlo Erba (Milão, Itália) completam a lista de reagentes, todos grau P.A., empregados nas reações de metabolismo. Para a determinação de

proteínas totais (PP) na fração microssomal foi utilizado o KIT da Labtest (Belo Horizonte, Brasil), contendo padrão de soro-albumina bovina e solução de biureto.

4.3.5.2. Animais

Ratos machos, da espécie Wistar, pesando entre 180 a 220 g foram obtidos do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – n. 09.1.1249.53.3).

4.3.5.3. Procedimento de obtenção da fração microssomal do fígado de ratos

O procedimento utilizado para obtenção da fração microssomal de fígado de ratos é o mesmo descrito no *item 2.3.5.3 (Capítulo 2).*

4.3.5.4. Estudo do metabolismo in vitro da Ranolazina

A avaliação do metabolismo enantiosseletivo da RNZ foi realizada através da medida da taxa de desaparecimento de cada enantiômero da RNZ e do aparecimento da DRNZ no meio de incubação. O sistema de incubação consistiu de 125 µL do sistema de regeneração NADPH (1,7 mg mL^{-1} de NADP, 7,8 mg mL^{-1} de glicose-6-fosfato e 1,5 unidades mL^{-1} de glicose-6-fosfato desidrogenase em tampão Tris-HCl (50 mmol L^{-1}/KCl 0,154 mol L-1, pH 7,4), 10 a 80 µL de microssomas hepáticos de ratos na concentração de 25 mg de proteína mL^{-1} (para alcançar concentrações finais de 0,5 a 4 mg mL^{-1}) e tampão fosfato de sódio 0,5 mol L^{-1}, pH 7,4 (volume suficiente para completar 0,5 mL de meio de incubação). As incubações foram realizadas em triplicata (n = 3) utilizando um agitador banho-maria a 37 ° C em tempos de 0 a 60 min. O metabolismo foi interrompido pela etapa de extração, já que os solventes utilizados na DLLME são desnaturizantes proteicos. As amostras foram analisadas por LC-MS-MS. Incubações controle foram realizadas na ausência do sistema de regeneração do NADPH e na ausência de microssomas hepáticos de ratos.

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. Separação dos enantiômeros da RNZ e DRNZ empregando fases estacionárias quirais

A resolução dos enantiômeros da RNZ e DRNZ foi avaliada utilizando várias colunas quirais baseadas em antibióticos macrocíclicos (vancomicina), derivados de celulose (3,5-dimetilfenilcarbamato, 4-metilfenilcarbamato e 4-metilbenzoato) e amilose (3,5-dimetilfenilcarbamato). A separação também foi avaliada no modo normal e polar orgânico. No modo normal foram avaliadas fases móveis compostas por diferentes proporções de hexano, 2-propanol, metanol e etanol. Já no modo polar orgânico, foram avaliadas fases móveis compostas por 100% de acetonitrila, metanol, etanol ou 2-propanol e também fases móveis compostas por diferentes combinações destes solventes.

A separação adequada com um tempo de análise total de 17 min foi alcançada empregando uma coluna Chiralcel OD-H® (tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose), com fase móvel composta por hexano:etanol (60/40, v/v) e 0,05% de dietilamina, na vazão de 1,0 mL min^{-1}. Sob essas condições, os valores de resolução entre os picos dos enantiômeros foram de 4,8 e 1,25 para RNZ e DRNZ, respectivamente (Figura 4.2).

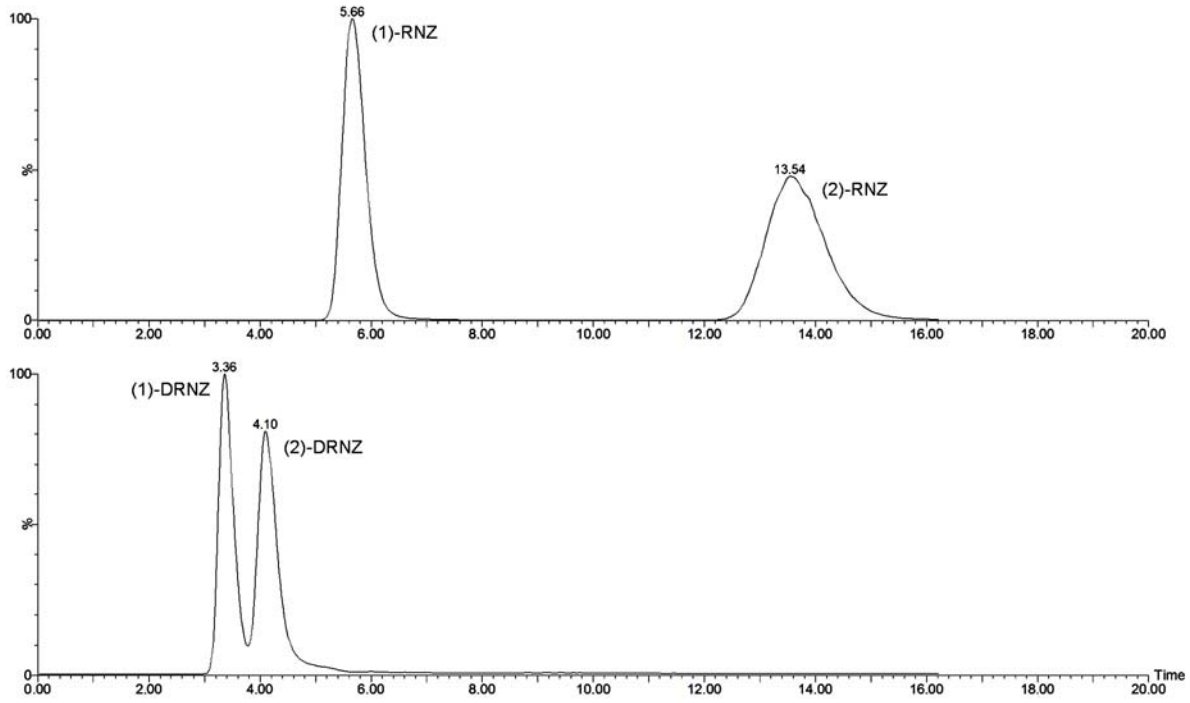


Figura 4.2 - Cromatogramas referentes a resolução dos enantiômeros da RNZ e DRNZ. Condições cromatográficas: coluna Chiralcel OD-H, fase móvel constituída por hexano:etanol (60/40, v/v) e 0,05% de dietilamina, vazão de 1,0 mL min^{-1}.

Apenas um método na literatura relata a separação dos enantiômeros da RNZ (LUO et al., 2006), entretanto o método não tem aplicação analítica, apenas preparativa. Nesse método a separação dos enantiômeros da RNZ foi alcançada empregando colunas quirais baseadas em tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (fase estacionária similar àquela da coluna Chiralpak AD®) e tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose (fase estacionária similar àquela da coluna Chiralcel OD®) produzidas pelos próprios pesquisadores. A separação simultânea enantiosseletiva da RNZ e um de seus metabólitos é inédita.

A ordem de eluição dos analitos no presente trabalho não foi determinada, pois não há dados na literatura para comparação que comprovem a configuração RS dos enantiômeros da RNZ e da DRNZ.

4.4.2. Otimização do procedimento de DLLME

Como previamente discutido no *item 1.1.2 (Capítulo 1),* vários fatores têm influência sobre a eficiência da DLLME. Para o presente trabalho foram escolhidos os seguintes parâmetros a serem avaliados: tipo do solvente extrator, tipo do solvente dispersante, volume

do solvente extrator, volume do solvente dispersante, volume da amostra aquosa, pH da amostra aquosa e banho ultra-sônico.

4.4.2.1. Solvente extrator e dispersante

A escolha dos SE e SD é um ponto crucial no desenvolvimento da DLLME, portanto, este deve ser invariavelmente o primeiro passo no procedimento de otimização da extração (WEN et al., 2011). Existem inúmeros solventes que obedecem as características necessárias a um solvente extrator e dispersante para a DLLME (*item 1.1.2, Capítulo 1*). Para a extração da *rac*-RNZ e *rac*-DRNZ, o diclorometano, clorofórmio, 1,1-dicloroetano e tetracloreto de carbono foram avaliados como SE e acetona, metanol, etanol e acetonitrila como SD. Nesses experimentos, 600 µL das soluções extratoras (100 µL do SE e 500 µL do SD) de todas as possíveis combinações entre os SE e SD foram injetados em 4 mL das amostras (0,5 mL do meio de incubação + 3,5 mL de água). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 4000 rpm. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

As soluções extratoras que tiveram álcoois como SD não geraram bons resultados. Utilizando-se o clorofórmio, o diclorometano e o tetracloreto de carbono como SE e metanol como SD não foi possível obter uma fase sedimentada límpida sendo, portanto, incompatível com o sistema cromatográfico. Com relação ao etanol, não foi possível obter a fase sedimentada com nenhum dos SEs, provavelmente devido a maior capacidade do etanol em solubilizar os SEs utilizados.

Já as soluções extratoras que tiveram a acetona e acetonitrila como SD mostraram bons resultados. A Figura 4.3 mostra a influência das combinações entre os solventes. Clorofórmio e acetona mostraram os melhores resultados na recuperação dos enantiômeros da RNZ e DRNZ e, portanto, foram escolhidos para as próximas etapas da otimização da DLLME.

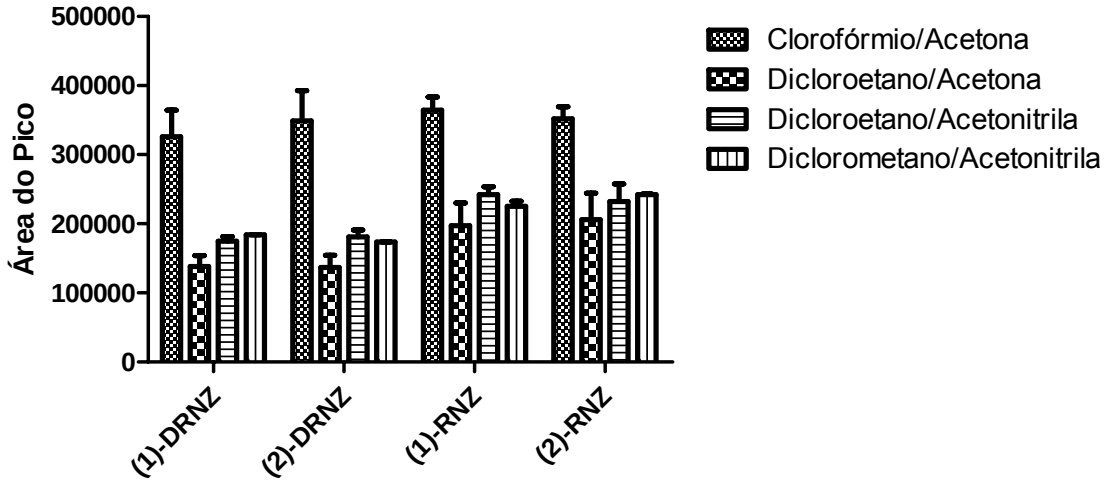


Figura 4.3 - Avaliação do solvente extrator e dispersante na extração da RNZ e DRNZ. Condições de extração: volume da solução extratora de 600 µL,volume final da amostra de 4 mL, pH, 7,4 e centrifugação por 5 min.

4.4.2.2. Avaliação do volume do solvente extrator e dispersante

Uma vez definidos os solventes extrator e dispersante, deve-se avaliar a adequada relação entre os seus volumes. A Figura 1.4 (Capítulo 1) mostra claramente a intrincada influência dos volumes do SE, SD e da amostra no volume da fase sedimentada, na eficiência da formação da *cloudy solution* e, finalmente, na eficiência da extração. Para a otimização do volume do SE e SD na DLLME existem duas abordagens básicas: tentativa de obtenção de alto fator de enriquecimento e/ou alta recuperação absoluta.

O fator de enriquecimento (FE) é definido como a razão entre a concentração do analito na fase sedimentada (C_{sed}) e a concentração teórica inicial do analito na matriz (C_0) (REZAEE et al., 2006):

$$FE = \frac{C_{sed}}{C_0}$$

Logo, considerando o volume da amostra constante, quanto menor for o volume da fase sedimentada (SE) capaz de solubilizar o analito de interesse, maior será o FE. Altos valores de FE são mais importantes para aquelas metodologias onde pretende-se injetar uma fração da fase sedimentada diretamente no sistema analítico, pois quanto maior o FE maior será a resposta do equipamento.

A recuperação absoluta (RA) é definida como a porcentagem da quantidade inicial do analito na amostra (n_0) extraída pela fase sedimentada (n_{sed}) (REZAEE et al., 2006):

$$RA = \frac{n_{sed}}{n_0} \times 100$$

ou

$$RA = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_o \times V_{aq}} \times 100$$

Onde, C_{sed} é a concentração do analito na fase sedimentada, C_0 é a concentração inicial do analito na amostra, V_{sed} e V_{aq} são o volume da fase sedimentada e aquosa, respectivamente.

Neste caso, é possível obter altos valores de recuperação, mesmo que os valores de enriquecimento não sejam tão altos. Para isso é necessário eliminar o solvente da fase sedimentada recuperada e dissolver os analitos no menor volume possível da fase móvel para a introdução da amostra no sistema cromatográfico.

A estabilidade das colunas quirais disponíveis comercialmente frente aos solventes extratores comumente utilizados na DLLME não é bem estabelecida e a injeção direta destes solventes pode causar danos irreversíveis a estas colunas. Desta forma, neste trabalho, a recuperação absoluta foi priorizada em detrimento do fator de enriquecimento, pois os extratos obtidos foram sempre evaporados a secura antes do processo de análise.

Diferentemente da SPME (PAWLISZYN, 2003), a DLLME não tem uma fundamentação teórico-matemática muito bem estabelecida. O desenvolvimento de equações que mostrem a relação entre os importantes fatores em DLLME (tipo e volume do SE e SD) precisa ser conduzido urgentemente (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010). Por exemplo, não existe uma equação em DLLME para o cálculo dos volumes do SE, SD e fase aquosa sem a obrigatória investigação experimental. Assim, por enquanto, a otimização dos volumes dos SE e SD deve ser feita empiricamente.

Neste trabalho foi seguida a seguinte linha de raciocínio para a escolha dos volumes a serem avaliados: o volume do SE deve ser pequeno o suficiente para caracterizar uma microextração (não maior que 100 μL) e grande o suficiente para a formação adequada da fase sedimentada. Experimentos preliminares neste sentido foram realizados e percebeu-se que a utilização de volumes inferiores a 25 μL de SE levaram à formação inadequada da fase sedimentada. Portanto, os volumes de 25, 50 e 100 μL foram escolhidos. Para o SD, foram

escolhidos valores entre 450 e 800 microlitros. O volume da solução extratora sempre foi a soma dos volumes do SE e SD. Todo o volume da fase sedimentada foi coletado e seco sob fluxo de ar comprimido. O extrato foi dissolvido em 50 µL de fase móvel e 20 µL foram introduzidos no cromatógrafo.

A Figura 4.4 mostra que a melhor combinação de SE e SD na extração dos enantiômeros da RNZ e DRNZ foi 100 µL de clorofórmio e 800 µL de acetona. Ao que parece, um volume baixo de acetona em comparação ao clorofórmio faz com que a *cloudy solution* não seja bem formada e, assim, a eficiência da recuperação é menor (REZAEE et al., 2006). Nestas condições é possível a obtenção de aproximadamente 100 µL da fase sedimentada, o que mostra boa eficiência da formação da *cloudy solution*.

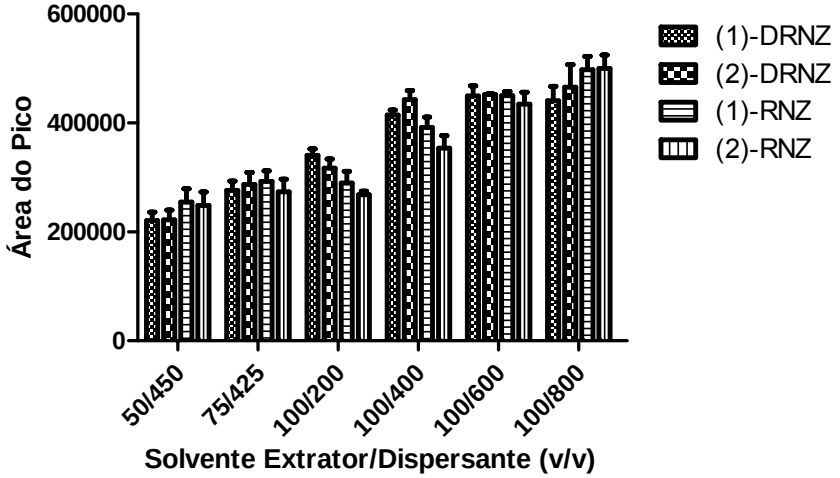


Figura 4.4 - Avaliação do volume dos solventes extrator e dispersante na eficiência da extração da RNZ e DRNZ. Condições de extração: clorofórmio como SE, acetona como SD, pH 7,4 e centrifugação por 5 min.

4.4.2.3. Volume da amostra

A relação entre o volume de água e a solução extratora pode melhorar ou piorar a formação da dispersão e, consequente, a formação da fase sedimentada (REZAEE et al., 2006). Portanto, o efeito do volume da amostra foi avaliado pela extração de diferentes volumes finais da amostra fortificada com a mesma concentração dos analitos.

Num tubo cônico de 10 mL foram adicionados 0,5 mL da matriz microssomal fortificada com a *rac*-RNZ e *rac*-DRNZ. A esta amostra foram adicionados 0, 0,5, 1,5, 3,5 e 5,5 mL de água para alcançar volumes finais de 0,5, 1, 2, 4 e 6 mL, respectivamente. Então, foram adicionados 900 µL da solução extratora (clorofórmio/acetonitrila) àquelas amostras.

Nas amostras com volumes de 0,5 e 1 mL não foi possível obter a formação eficiente da *cloudy solution* e, portanto, não houve formação adequada da fase sedimentada. Por

outro lado, a Figura 4.5 mostra que com o aumento do volume da fase aquosa ocorre a diminuição da recuperação dos analitos, pois a capacidade de solubilização dos analitos pela fase aquosa aumenta com o aumento da razão fase aquosa/fase orgânica. Portanto, o volume final de 2 mL foi escolhido para dar prosseguimento à otimização.

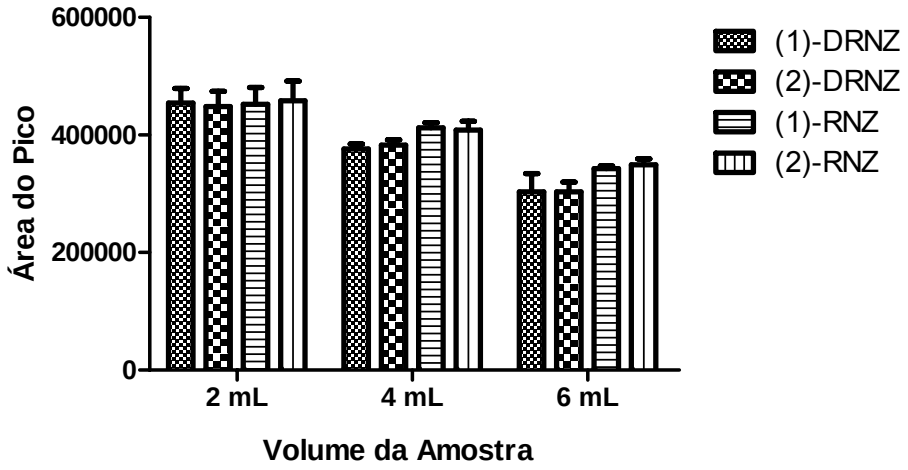


Figura 4.5 - Avaliação do volume da amostra na eficiência da extração da RNZ e DRNZ. Condições de extração: 100 µL de clorofórmio como SE, 800 µL de acetona como SD, pH 7,4 e centrifugação por 5 min.

4.4.2.4. pH da amostra

Tanto a RNZ quanto a DRNZ se comportam como bases fracas e têm pKa próximos a 6,5 (SCIFINDER, 2012). Portanto, a influência do ajuste do pH na extração destes analitos foi avaliada em até duas unidades acima do pKa, pois é nesta faixa que estatisticamente todas as moléculas estarão na forma não ionizada e, consequentemente, com maior afinidade pelo clorofórmio (SE). O pH 7,4 também foi especialmente avaliado, pois este é o pH do meio de incubação.

Os dados apresentados na Figura 4.6 mostram que não há diferença na eficiência da extração entre o pH 7,4 (normal do meio de incubação), 8,0 e 9,0. Isso é um fator muito interessante, pois desta forma não há necessidade do ajuste do pH da amostra, portanto diminuindo uma etapa no procedimento da DLLME e, consequentemente, uma fonte de introdução de erro analítico.

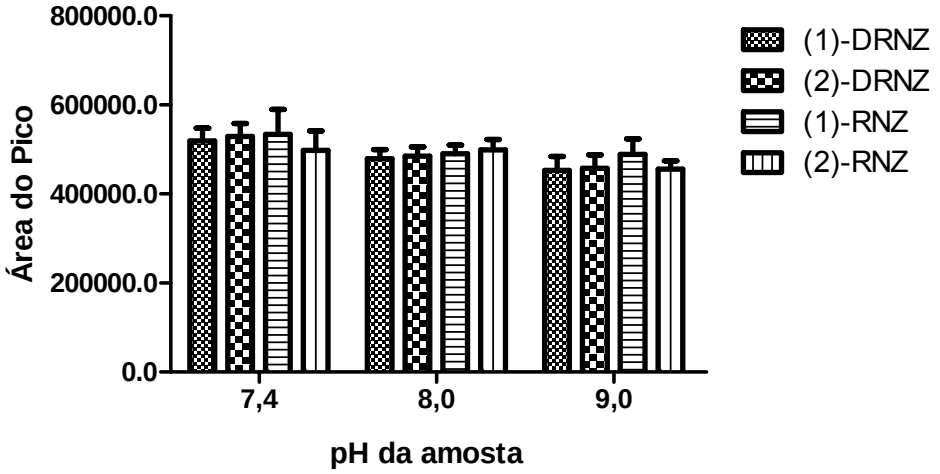


Figura 4.6 - Avaliação da influência do pH da amostra na eficiência da extração da RNZ e DRNZ. Condições de extração: 100 µL de clorofórmio como SE, 800 µL de acetona como SD, volume final da amostra de 2 mL, centrifugação por 5 min.

4.4.2.5. Banho ultrassônico

A dispersão da mistura extratora na amostra é um ponto crítico na DLLME (LIAO et al., 2011). Quanto menor o tamanho das gotículas do SE, maior será a superfície de contato e mais eficiente será a extração. O banho ultra-sônico pode melhorar a eficiência da dispersão, pois durante a agitação ultrassônica, são produzidas intensas ondas de choque entre as moléculas dos solventes gerando micro jatos de alta velocidade os quais podem causar o rompimento das gotículas do SE (fase dispersa), produzindo então gotículas ainda menores. Além disso, o aumento da energia cinética do sistema aumenta a velocidade de transferência de massas (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2007). Então, a influência da sonicação foi avaliada entre 0 e 5 min. A Figura 4.7 mostra que não há diferença significativa na eficiência da extração sem sonicação (0 min) e com sonicação (1, 3 e 5 min). Isso mostra que velocidade de injeção da mistura SE/SD na amostra aquosa gerou energia suficiente para a adequada formação da *cloudy solution* (dispersão).

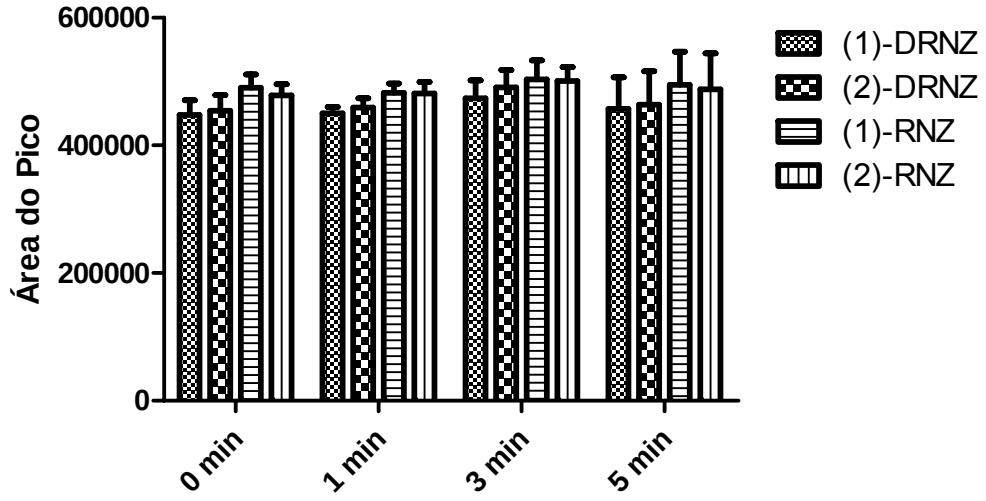


Figura 4.7 - Avaliação da influência do banho ultrassônico na eficiência da extração da RNZ e DRNZ. Condições de extração: 100 µL de clorofórmio como SE, 800 µL de acetona como SD, volume final da amostra de 2 mL, centrifugação por 5 min.

4.4.2.6. Tempo de extração e centrifugação

O tempo de extração é um dos mais importantes fatores na maioria dos procedimentos de extração, em especial em técnicas de microextração como a SPME e a HF-LPME, já que estes são procedimentos não exaustivos e o ponto de equilíbrio de distribuição dos analitos entre a amostra e a fase extratora é altamente dependente do tempo (Raezel 2006, Pawliszyn, 2001). Em DLLME, o tempo de extração é definido como o intervalo entre a injeção da solução de extração (SE/SD) e o começo da centrifugação (REZAEE et al., 2006). Inúmeros trabalhos da literatura mostram claramente que está variável é estatisticamente desprezível para a DLLME (SUNA; SHIA; CHENA, 2011; CAMPILLO et al., 2011; FARAJZADEH; BAHRAM; JÖNSSON, 2007; WEI; LI; WANG, 2007; FARAJZADEH; VARDAST; BAHRAM, 2009; FARHADI; MATIN; HASHEMI, 2009; ZHOU; PANG; XIAO, 2009; CHEN et al., 2009; CHEN et al., 2008; WU et al., 2009), portanto a influência do tempo sobre a eficiência da extração não foi avaliada. Assim, imediatamente após a injeção da solução de extração foi feita a centrifugação.

A centrifugação é necessária para desestabilizar a dispersão e acelerar a separação das fases (LIAO et al., 2011). A centrifugação foi avaliada nos tempos de 3, 5, 10 e 20 min. Após apenas 3 min de centrifugação a 4000 rpm a amostra já apresentava três camadas distintas. De cima para baixo: a primeira camada (límpida) é aquosa e rica em acetona (SD); a segunda é uma fina camada rica em fragmentos celulares e macromoléculas oriundas da matriz biológica e uma terceira camada também límpida referente ao SE. Esta característica da amostra após a centrifugação é extremamente interessante quando se trata da aplicação da DLLME em

matrizes complexas, pois um dos grandes inconvenientes do uso da DLLME nestes tipos de matrizes é quando ao final da centrifugação existem partículas sedimentadas junto ao SE.

4.4.2.7. Parâmetros otimizados

- Solvente extrator: clorofórmio (100 μL)
- Solvente dispersante: acetona (800 μL)
- Volume da amostra: 2 mL
- pH: 7,4
- Centrifugação: 3 min

4.4.3. Validação do método

4.4.3.1. Linearidade e limite de quantificação

O método mostrou ser linear no intervalo de concentração entre 10 - 1000 ng mL^{-1} para cada enantiômero da DRNZ, com coeficiente de correlação $r \geq 0,99$ e no intervalo de concentração entre 25 - 2500 ng mL^{-1} para cada estereoisômero da RNZ, com coeficiente de correlação $r \geq 0,98$ (Tabela 4.2). Os desvios do valor teórico (E%) de cada ponto da curva analítica ficaram dentro dos limites aceitáveis de 20% para a concentração correpondente ao limite de quantificação e 15% para as demais concentrações (ANVISA).

Tabela 4.2 - Linearidade do método de análise da RNZ e DRNZ.

Analito	Intervalo (ng mL^{-1}) (ng/mL)	Equação linear	*r**
(1)-RNZ	25 – 2500	y=2181x+49060	0,9873
(2)-RNZ	25 – 2500	y=2784x+55503	0,9891
(1)-DRNZ	10 – 1000	y=200x+888	0,9953
(2)-DRNZ	10 – 1000	y=225x+1179	0,9944

* coeficiente de correlação.

Os limites de quantificação (LOQs) do método validado foram de 25 ng mL^{-1} para cada enantiômero da RNZ e 10 ng mL^{-1} para cada enantiômero da DRNZ. Os valores de CV (%) e E (%) obtidos na avaliação desse parâmetro foram inferiores a 15%. (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Limite de quantificação do método de análise da RNZ e DRNZ.

Analito	Concentração nominal ($ng\ mL^{-1}$)	Concentração obtida ($ng\ mL^{-1}$)	Exatidão E(%)[a]	Precisão CV(%)[b]
(1)-RNZ	25	25	0	7
(2)-RNZ	25	24	-4	4
(1)-DRNZ	10	9	-5	11
(2)-DRNZ	10	9	-7	10

[a] coeficiente de variação percentual; [b] erro relativo em porcentagem.

Os LOQs obtidos para os enantiômeros da RNZ são comparáveis aos obtidos em métodos bioanalíticos para este fármaco relatados na literatura, os quais variam de 5 (BHAUMIK et al., 2008) a 50 ng mL^{-1} (LIANG et al., 2006). É importante ressaltar que estes métodos não são enantiosseletivos, portanto estes valores de LOQ seriam duplicados caso a análise fosse enantiosseletiva. Além disso, os LOQs são baixos o suficiente para acompanhar a metabolização do fármaco com a formação de menos de 1% do metabólito.

4.4.3.2.Recuperação

Os valores médios de recuperação variaram entre 53 e 59% para os enantiômeros da RNZ e entre 45 e 46% para os enantiômeros da DRNZ (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Recuperação do método de análise da RNZ e DRNZ.

Analito (**ng mL^{-1}**, *n* = 3)[a]	**Recuperação (%)**	**CV[b](%)**
(1)-RNZ		
75	50	2
750	55	3
1875	57	2
Média	*54*	*7**
(2)-RNZ		
75	54	6
750	62	0
1875	62	1
Média	*59*	8*
(1)-DRNZ		
30	38,9	4
500	48,5	3
750	49,2	2
Média	*45,5*	*13**
(2)-DRNZ		
30	40	5
500	49	2
750	50	4
Média	*47*	*13**

[a] numero de replicatas; [b] coeficiente de variação percentual; *coeficiente de variação percentual entre as replicatas das três concentrações.

O método de extração não é enantiosseletivo, portanto, o que explica a pequena variação entre as recuperações dos enantiômeros, especialmente dos enantiômeros da RNZ, são erros analíticos intrinsecos à técnica. Entretanto, os valores de CV (%) para as recuperações de todos os analitos foram inferiores a 15%, sendo portanto coerente com os mais importantes protocolos de validação de métodos bioanalíticos (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

4.4.3.3. Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas em ensaios realizados intradia (Tabela 4.4) e interdias (Tabela 4.5). Os valores de CV (%) e E (%) foram inferiores a 15%.

Tabela 4.5 - Precisão e exatidão do método de análise da RNZ e DRNZ.

Analito	**Intradia (*n* = 5)**[a]			**Interdia(*n* = 3)**[b]		
ng mL^{-1}	**Concentração (ng mL^{-1})**	**CV(%)**[c]	**E(%)**[d]	**Concentração (ng mL^{-1})**	**CV(%)**[c]	**E(%)**[d]
(1)-RNZ						
75	701	7	-6	77	7	2
750	698	1	-7	729	8	-3
1875	1844	2	-2	1811	5	-3
(2)-RNZ						
75	70	5	-6	74	5	-1
750	727	4	-3	755	3	1
1875	1893	1	1	1848	2	-1
(1)-DRNZ						
30	32	7	5	32	0	6
500	467	4	-7	477	3	-5
750	664	3	-12	695	4	-8
(2)-DRNZ						
30	32	3	6	33	2	8
500	462	2	-8	469	3	-6
750	666	3	-11	705	5	-6

a) número de determinações; b) número de dias; c) coeficiente de variação percentual; d) erro relativo em porcentagem.

4.4.3.4. Estabilidade

Para avaliar a estabilidade dos analitos à temperatura ambiente, as amostras foram mantidas a 25 °C ± 2 por 12 horas, sobre a bancada. Além disso, a estabilidade dos analitos sob as condições de incubação foi analisada expondo-os a 37 °C por 60 min em meio microssomal sem o sistema de regeneração-NADPH. Os analitos mostraram-se estáveis nas condições estudadas, pois não foram observadas diferenças (E% ≤ 15%) entre os resultados obtidos com amostras frescas, recentemente preparadas e processadas e os resultados obtidos

quando as amostras foram mantidas à temperatura ambiente e na condição de incubação (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 - Estabilidade do método de análise dos enantiômeros da RNZ e DRNZ.

Analito (n=6)[a)]	**Concentrações Avaliadas (ng mL^{-1})**	**Desvio do valor nominal (E%) (Fresco)**	
		Incubação	**Bancada**
(1)-RNZ	75	8	-4
	1875	-7	-5
(2)-RNZ	75	5	2
	1875	-5	-7
(1)-DRNZ	30	-4	-9
	750	0	-6
(2)-DRNZ	30	-11	-14
	750	-2	-3

4.4.3.5. Efeito da matriz na ionização dos analitos

O efeito da matriz foi analisado para garantir que componentes oriundos da matriz que possam coeluir com os picos dos analitos de interesse não interferem na ionização destes na fonte ESI. Através da comparação de amostras "brancas" extraídas e, em seguida, fortificadas com os enantiômeros da RNZ e DRNZ, com padrões injetados nas mesmas concentrações, pode-se concluir que as diferença das respostas do MS foi inferior a 15% entre os grupos avaliados (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 - Efeito da matriz sobre a ionização dos enantiômeros da RNZ e DRNZ.

Analito	**Concentração (ng mL^{-1})**	**Efeito da matriz (%)**	**CV (%)[a]**
(1)-RNZ	30	9	4
(2)-RNZ	30	13	7
(1)-DRNZ	10	1	10
(2)-DRNZ	10	-4	9

[a] coeficiente de variação em porcentagem

4.4.4. Estudo do metabolismo *in vitro* da ranolazina

O metabolismo *in vitro* da RNZ foi avaliado variando-se a concentração de proteínas do meio de incubação e o tempo de incubação.

4.4.4.1. Concentração de proteínas

A concentração de proteínas no meio microssomal é um indicativo da concentração de enzimas do Citocromo P450, portanto, quanto maior a concentração proteica maior a quantidade de enzimas metabolizantes. Foram realizadas incubações em triplicata nas seguintes concentrações de proteína microssomal: 0, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mg de proteína por mL de meio de incubação. A concentração de substrato nominal utilizada nestes experimentos foi de 1875 ng mL^{-1} para cada enantiômero da RNZ. A Figura 4.8 mostra o comportamento metabólico da RNZ frente a diferentes concentrações de proteínas.

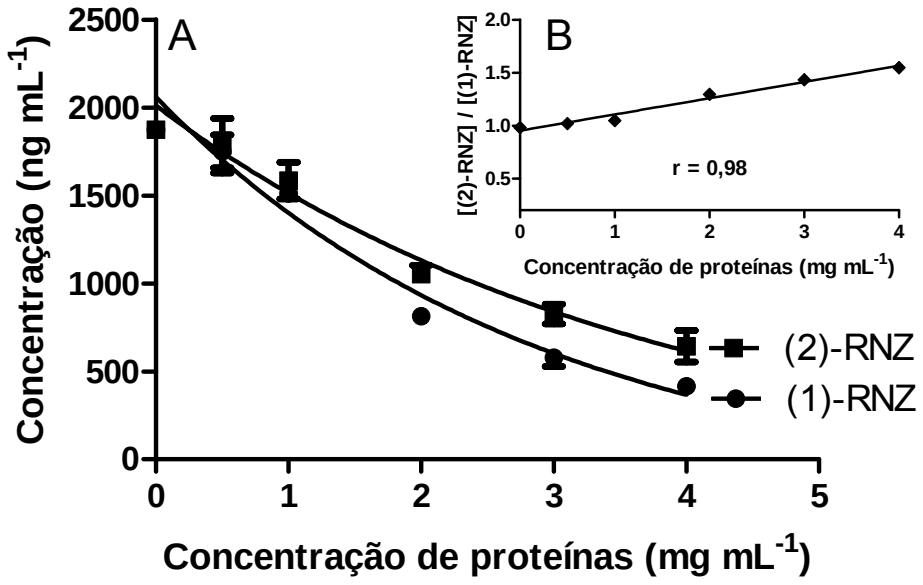


Figura 4.8 - A) Influência da concentração de proteínas microssomais na metabolização da RNZ. Condições de incubação da RNZ: 15 min a 37°C, sistema de regeneração NADPH constituído por $NADP^+$ (1,7 mg mL^{-1}), glicose-6-fosfato (7,8 mg mL^{-1}) e glicose-6-fosfato dehidrogenase (1,5 unidades mL^{-1}). B) Correlação entre as concentrações dos dois enantiômeros da RNZ.

A metabolização mostrou uma enantiosseletividade linear em toda a faixa de concentração de proteínas analisada (Figura 4.8.B). A medida em que a concentração de proteínas aumentou, a razão entre as concentrações dos dois enantiômeros também aumentou, indicando que o enantiômero (1)-RNZ está sendo preferencialmente metabolizado. Os

enantiômeros do suposto metabólito DRNZ foram detectados mas os sinais ficaram abaixo do limite de quantificação do método (10 ng mL^{-1}). Apesar de Jerling (2006) ter relatado a DRNZ como um dos principais metabólitos da RNZ, a DRNZ não foi produzida neste experimento de maneira significativa. Uma das possíveis explicações para isso é que o modelo de metabolismo empregado no nosso estudo (microssomas hepáticos de ratos) seja diferente do modelo empregado por Jerling (2006). Esta hipótese não pode ser devidamente confirmada já que o trabalho publicado por esse autor não mostra detalhes experimentais importantes, como por exemplo, qual modelo específico de avaliação do metabolismo foi utilizado. A diminuição nas concentrações dos enantiômeros da RNZ (Figura 4.8.A) de forma enantiosseletiva pode ser resultante da formação de outros metabólitos não detectados pelo método proposto.

4.4.4.2. Tempo de incubação

Com o intuito de avaliar o comportamento metabólico da RNZ ao longo do tempo, o racemato do substrato foi incubado por 0, 5, 10, 20, 30, 45 e 60 min num meio de incubação contendo 2 mg de proteína microssomal por mL (Figura 4.9.A). A Figura 4.9.B mostra que a enantiosseletividade na biotransformação da RNZ durante a faixa de tempo avaliado segue o mesmo perfil linear observado na variação de proteínas.

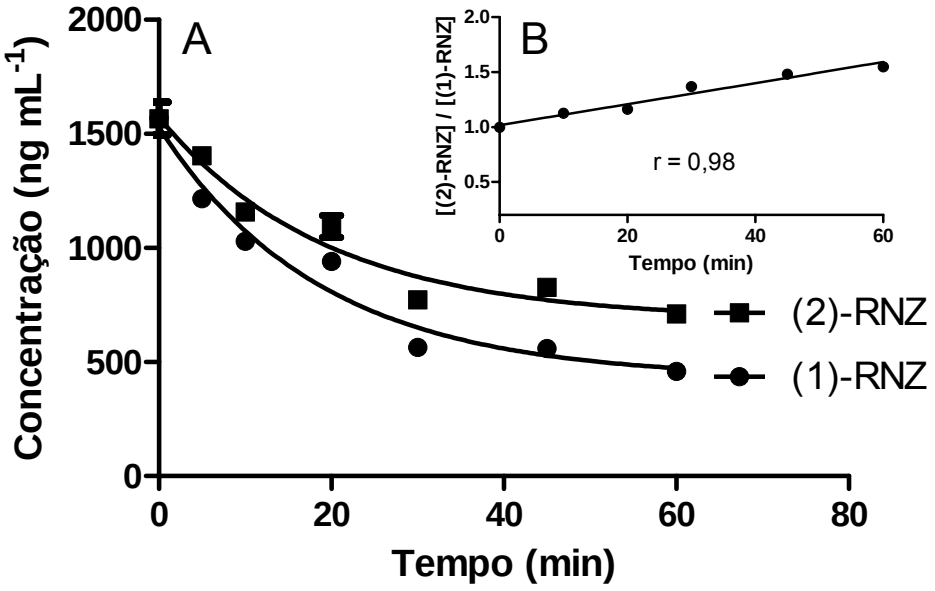


Figura 4.9 - A) Influência do tempo de incubação na metabolização da RNZ. Condições de incubação: concentração de proteínas de 0,5 mg mL^{-1} a 37 °C, sistema de regeneração NADPH constituído por $NADP^+$ (1,7 mg mL^{-1}), glicose-6-fosfato (7,8 mg mL^{-1}) e glicose-6-fosfato dehidrogenase (1,5 unidades mL^{-1}). B) Correlação entre as concentrações dos dois enantiômeros da RNZ.

4.5. COMENTÁRIOS FINAIS

Neste capítulo foram apresentados os resultados referentes ao desenvolvimento, validação e aplicação de um método analítico enantiosseletivo para a avaliação do metabolismo do fármaco RNZ. A melhor condição cromatográfica foi alcançada utilizando a coluna Chiralcel OD-H® em modo normal de eluição. Este é o primeiro relato de um método enantiosseletivo para determinação simultânea da RNZ e seu metabólito DRNZ. A utilização da DLLME como técnica de preparação das amostras mostrou-se adequada e muito útil para estudos de metabolismo *in vitro*, pois é possível o encerramento das reações de metabolismo e extração dos analitos em uma mesma etapa. A metodologia apresentada é muito simples, rápida, reprodutível e forneceu excelentes valores de recuperação (≥ 45%). Esta técnica também foi empregada pela primeira vez para esse tipo de matriz.

O método enantiosseletivo desenvolvido e validado foi aplicado em um estudo de metabolismo *in vitro* usando microssomas de fígado de ratos. O estudo permitiu a avaliação do perfil metabólico enantiosseletivo da RNZ, o qual mostrou comportamento linear tanto em função de diferentes concentrações protéicas como também em diferentes tempos de incubação. O estudo realizado mostrou que o metabolismo da RNZ é enantiosseletivo com consumo preferencial do enantiômeros (1)-RNZ. Entretanto, o metabólito alvo não foi detectado em concentrações significativas no modelo de metabolismo empregado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Genéricos-Legislação-Resolução-RE. no. 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.htm. Acesso em 30 de outubro de 2011.

BHAUMIK, U.; GHOSH, A.; SARKAR, A. K.; BOSE A.; SELVAN, P. S.; SENGUPTA, P.; CHAKRABORTY, U. S.; GHOSH, D.; PAL, T. K. Determination of ranolazine in human plasma by LC–MS/MS and its application in bioequivalence study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 1404–1410, 2008.

CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; CACHO, J. I.; PEÑALVER, R.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Evaluation of dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of chlorophenols and haloanisoles in wines and cork stoppers using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7323-7330, 2010.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Ultrasound-assisted preparation of liquid samples. **Talanta**, v. 72, p. 321-334, 2007

CHEN, H.; CHEN, H.; YING, J.; HUANG, J.; LIAO, L. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 80-85, 2009.

CHEN, H.; YING, J.; CHEN, H.; HUANG, J.; LIAO, L. LC determination of chloramphenicol in honey using dispersive liquid-liquid microextraction. **Chromatographia**, v. 68, p. 629-634, 2008.

FARAJZADEH, M. A.; BAHRAM, M.; JÖNSSON, J. A. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-diode array detection as an efficient and sensitive technique for determination of antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v.591, p. 69-79, 2007.

FARAJZADEH, M. A.; VARDAST, M. R.; BAHRAM, M. Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction of irganox 1010 and irgafos 168 from polyolefins before liquid chromatographic analysis. **Chromatographia**, v. 69, p. 409-419, 2009.

FARHADI, K.; MATIN, A. A.; HASHEMI, P. L. C. determination of trace amounts of phenoxyacetic acid herbicides in water after dispersive liquid-liquid microextraction**.** **Chromatographia**, v. 69, p. 45-49, 2009.

FDA. United States Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (2001), http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatory Information/Guidances/default.htm. Acesso em 30 de outubro de 2011.

FRASER, H.; BELARDINELLI, L.; WANG, L. G.; LIGHT, P. E.; MCVEIGH, J. J.; CLANACHAN, A. S. Ranolazine decreases diastolic calcium accumulation caused by ATX-II or ischemia in rat hearts. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 41, p. 1031-1038, 2006.

HALE, S. L.; KLONER, R. A. Ranolazine, an Inhibitor of the Late Sodium Channel Current, Reduces Postischemic Myocardial Dysfunction in the Rabbit. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 11, p. 249-255, 2006.

HASENFUSS, G.; MAIER, L. S. Mechanism of action of the new anti-ischemia drug ranolazine. **Clinical Research In Cardiology**, v. 97, p. 222-226, 2008.

HERRON, W. J.; EADIE, J.; PENMAN, A. D. Estimation of ranolazine and eleven Phase I metabolites in human plasma by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry with selected-ion monitoring. **Journal of Chromatography A**, v. 712 , p. 55-60, 1995.

JERLING, M. Clinical pharmacokinetics of ranolazine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 45, p. 469-491, 2006.

LIANG, Y.; XIE, L.; LIU, X.; CHEN,W.; LU, T.; XIONG, Y.; WANG, G. Simple, sensitive and rapid liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric method for the quantitation of Ranolazine in rat plasma. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 523-528, 2006.

LIAO, X. X.; LIANG, B.; LI, Z. Z.; LI, Y. F. A simple, rapid and sensitive ultraviolet-visible spectrophotometric technique for the determination of ultra-trace copper based on injection-ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction. **The Analyst**, v. 36, p. 4580-4586, 2011.

LUO, X. P.; ZHAI, Z. D.; WU X. M ; SHI, Y. P; CHEN, L. R; LI, Y. M. Analytical and semipreparative resolution of ranolazine enantiomers by liquid chromatography using polysaccharide chiral stationary phases. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 164-171, 2006.

NASH, D. T.; NASH, S. D. Ranolazine for chronic stable angina. **Lancet**, v. 372, p. 1335-1341, 2008.

PAWLISZYN, J. Sample Preparation: Quo Vadis? **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 2543-2558, 2003.

REZAEE, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. R. M.; AGHAEE, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction, **Journal of Chromatography A** , v. 1116, p. 1-9, 2006.

REZAEE, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2342–2357, 2010.

SAJID, A; DAVID, G. Ranolazine (Ranexa®) in the Treatment of Chronic Stable Angina. **Advances in Therapy**, v. 27, p. 193-201, 2010.

SCIFINDER. Versão online do SciFinder. Disponível em : https://scifinder.cas.org. Acesso em 17 de janeiro de 2012.

SUNA, J. N.; SHIA, Y. P.; CHENA, J. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for sensitive determination of tracecelastrol in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 3429-3433, 2011.

WEI, G.; LI, Y.; WANG, X. Application of dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of methomyl in natural waters. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3262-3267, 2007.

WEN, Y. Y.; LI, J. H.; ZHANG, W. W.; CHEN, L. X. Dispersive liquid–liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis for simultaneous determination of sulfonamides with the aid of experimental design. **Electrophoresis**, v. 32, p. 2131–2138, 2011.

WU, Q. H.; LI, Y. P.; WANG, C.; LIU, Z. M.; ZANG, X. H.; ZHOU, X.; WANG, Z. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of carbendazim and thiabendazole in environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 638, p. 139-145, 2009.

ZHONG J.; LIU X. Q.; CHEN Y.; ZHAO X. P.; WANG Y. S.; WANG G. J. Determination of Ranolazine in Rat Plasma by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Chromatographia**, v. 63, p. 123-127, 2006.

ZHOU, Q.; PANG, L.; XIAO, J. Trace determination of dichlorodiphenyltrichloroethane and its main metabolites in environmental water samples with dispersive liquid-liquid microextraction in combination with high performance liquid chromatography and ultraviolet detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6680-6684, 2009.

Capítulo 5

Desenvolvimento de um método analítico para o estudo do metabolismo *in vitro* da repaglinida empregando *Multiblade* SPME/TFME-LC-MS-MS.

Os dados apresentados neste capítulo são frutos do estágio realizado no grupo de pesquisa do Prof. Dr. Janusz Pawliszyn, na Universidade de Waterloo, Waterloo, Canadá. O Dr. Pawliszyn é o inventor da técnica SPME e também o primeiro pesquisador a introduzir o conceito de microextração. Seu grupo de pesquisa tem destaque mundial na área de química analítica e tecnologia de preparação de amostras.

5.1. REPAGLINIDA

A repaglinida (RPG) é um estimulante da secreção da insulina e foi o primeiro composto da família das meglitinidas a se tornar disponível para uso por pacientes com diabetes mellitus Tipo 2; este fármaco está no mercado desde 1998 (NATTRASS; LAURITZEN, 2000). A molécula da RPG tem um carbono quiral, entretanto este fármaco é um exemplo dos fármacos quirais que são comercializados como enantiômero puro, neste caso, (S)-RPG.

A concentração plasmática máxima da RPG é alcançada em menos de 1 h após administração oral e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) é aproximadamente 1 a 2 h (NATTRASS; LAURITZEN, 2000; TRONIER; MARBURY; DAMSBO, 1995). Isto significa que a RPG é rapidamente absorvida no trato gastrintestinal, estimulando a secreção da insulina poucos minutos após sua administração por via oral. Portanto, a administração pré-prandial deste fármaco leva à rápida liberação da insulina durante e logo após as refeições, permitindo assim significante redução da hiperglicemia pós-prandial, sem o risco de quadros hipoglicêmicos

entre as refeições. A RPG estimula as células β-pancreáticas através do bloqueio dos canais de K^+ ATP - dependentes (FUHLENDOR et al., 1998).

A RPG é extensivamente biotransformada pelas enzimas do sistema Citocromo P450 (CYP 450), sendo que menos de 2% da dose oral é excretada na urina na forma inalterada. O trabalho de maior relevância no que se refere à caracterização do metabolismo *in vitro* da RPG foi realizado por Bidstrup et al. (2003). Neste estudo, a [^{14}C]-RPG foi incubada com isoenzimas CYP recombinantes e com microssomas humanos de doadores individuais na presença de anticorpos específicos para enzimas específicas do CYP. Os metabólitos foram analisados por HPLC com detecção radioquímica, por LC-MS-MS e em um equipamento LC-MS acoplado também a um espectrômetro de ressonância magnética nuclear (LC-MS-RMN). O principal foco do trabalho foi a identificação dos metabólitos oriundos do metabolismo *in vitro* da RPG e das isoformas do CYP responsáveis por este processo. Neste aspecto o trabalho obteve grande êxito. Os pesquisadores constataram que as isoformas CYP2C8 e CYP3A4 são as principais enzimas do sistema CYP 450 envolvidas no metabolismo da RPG. Dentre os principais metabólitos formados estão o 2-despiperidil-2-(5-carboxipentilamina) RPG (DC-RPG) e o 2-despiperidil-2-amino RPG (DA-RPG). As estruturas químicas da RPG, DA-RPG e DC-RPG estão representadas na Figura 5.1. Diferentemente do trabalho desenvolvido por Bidstrup et al. (2003), o enfoque do trabalho apresentado neste capítulo é o desenvolvimento de um método analítico validado como ferramenta para futuros estudos quantitativos do metabolismo da RPG.

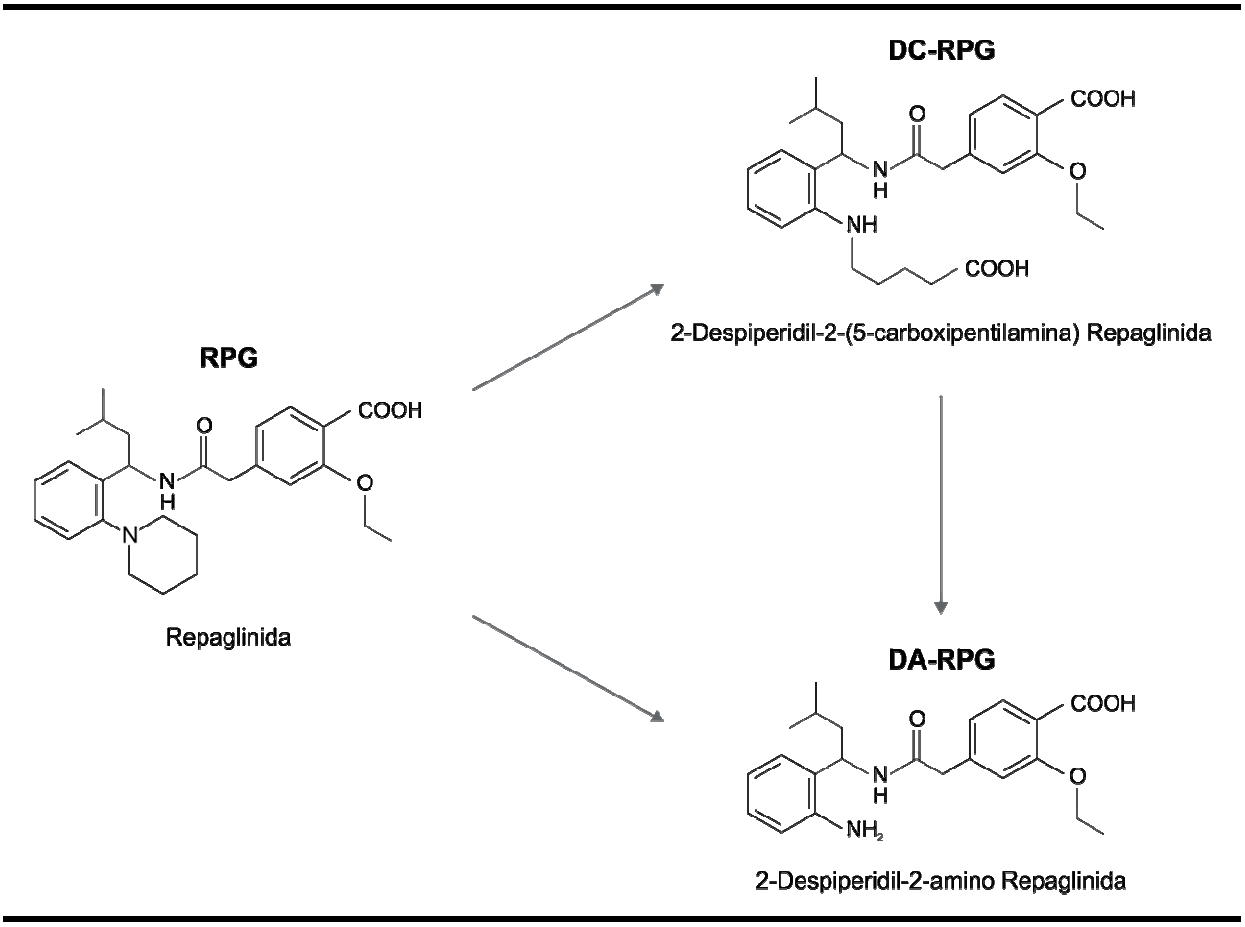


Figura 5.1 – Estruturas químicas da repaglinida e seus principais metabólitos.

Nos últimos sete anos, apenas cinco métodos validados para a quantificação da RPG em fluidos biológicos foram publicados (JIROVSKY et al., 2010; RUZILAWATI et al., 2007; PETSALO et al., 2008; KAUSHAL; JAIN; TIWARY, 2010; HESS; MUSSHOFF; MADEA, 2011). Todos os métodos utilizaram colunas cromatográficas do tipo C18, com exceção do método descrito por Hess et al. (2011), no qual os autores empregaram uma coluna C8 para a análise de 11 fármacos anti-hiperglicemiantes em plasma humano, dentre eles a RPG (HESS; MUSSHOFF; MADEA, 2011). Neste trabalho, a técnica de preparação das amostras foi a LLE e um limite de quantificação de 1 ng mL^{-1} foi alcançado empregando ESI-MS-MS como técnica de detecção. Jirovský et al. (2010) desenvolveram um método empregando a LLE como técnica de extração e detecção coulométrica para a determinação da RPG em plasma humano. O limite de quantificação alcançado por estes autores foi em torno de 2,5 ng mL^{-1} (JIROVSKY et al., 2010). Ruzilawati et al. (2007) utilizaram a PP como técnica de preparação de amostras; empregando um detector UV-vis obtiveram um limite de quantificação de 20 ng mL^{-1} (RUZILAWATI et al., 2007). O método foi empregado em um estudo farmacocinético em humanos. Petsalo et al. (2008) empregaram LC-MS-MS para

quantificação de doze marcadores de isoformas das enzimas do CYP 450 em urina humana; entre os analitos estão a RPG e um de seus metabólitos, a hidróxi-RPG (PETSALO et al., 2008). Entretanto, os autores relatam que não foi possível obter o padrão analítico da hidróxi-RPG e, portanto, foi possível obter apenas uma estimativa da concentração deste analito. O limite de quantificação para a RPG foi de 0,4 ng mL^{-1}. Kaushal, Jain e Tiwary (2010) desenvolveram um método utilizando um detector espectrofluorimétrico para a quantificação da RPG tanto em formulações farmacêuticas quanto em um fluído obtido em testes de permeação *in vitro*(KAUSHAL; JAIN; TIWARY, 2010).

Os dados acima mostram que a determinação simultânea da RPG, DA-RPG e DC-RPG em matrizes biológicas ainda não foi descrita na literatura e que todos os métodos descritos fazem uso de técnicas tradicionais de preparação das amostras.

5.2. OBJETIVOS

Desenvolvimento de um método bioanalítico empregando a SPME/TFME no modo *96-blade* e LC-MS-MS, visando à quantificação da RPG, DA-RPG e DC-RPG para aplicação em um estudo de metabolismo *in vitro* da RPG empregando fração microssomal de fígado humano. O método desenvolvido não é enantiosseletivo já que o fármaco é comercializado como enantiômero puro.

5.3. MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1. Soluções-padrão

A RPG, DA-RPG, DC-RPG e RPGd5 (padrão interno) usados na preparação das soluções-padrão foram obtidos da Toronto Research Chemical Inc. (North York, Canadá). As soluções-padrão foram preparadas em metanol grau HPLC (Caledon Laboratories, Georgetown, Canadá) e armazenadas à temperatura de -30 °C (RUZILAWATI et al.; 2007).

5.3.2. Análise cromatográfica - Instrumentação e condições analíticas

As análises e validação do método foram conduzidas utilizando um equipamento LC–MS-MS triplo quadrupolo, equipado com um injetor automático refrigerado modelo Accela *autosampler*, bomba de duplo pistão modelo Accela LC *pumps* e um espectrômetro de massas modelo *TSQ Vantage* com fonte de ionização ESI (Thermo Fisher Scientific, EUA). A aquisição dos dados foi feita através do programa Xcalibur (version 2.0.7. SP1).

A análise cromatográfica foi feita empregando uma coluna Symmetry Shield RP18 (2,1 mm × 50 mm e partículas de 5 µm, Waters, Milford, EUA). Para a proteção da coluna cromatográfica foi empregada uma coluna de guarda C18 (4,6 x 12,5 mm, partículas de 5 µm, Phenomenex, Torrance, EUA). Os analitos foram parcialmente separados empregando a fase móvel constituída por ACN:água (50/50, v/v) com 0,1% de ácido acético, na vazão de 0,5 mL min^{-1}. As condições gerais do MS foram: voltagem do *spray* (*spray voltage*) = 3800 V; temperatura de vaporização (*vaporizer temperature*) = 300 °C; pressão do gás de dessolvatação (*sheath gas pressure*) = 45; pressão do gás auxiliar (*auxiliary gas*)= 20; e temperatura do capilar (*capillary temperature*) = 275 °C. Todas as análises foram realizadas no modo positivo (+ESI). A otimização dos parâmetros do MS-MS foi feita por infusão direta das soluções dos analitos preparadas na concentração de 1 µg mL^{-1} em ACN:água (50/50, v/v), na vazão de 10 µL min^{-1}. Os parâmetros ajustáveis para cada substância estão definidos na Tabela 5.1. A ACN e o ácido acético, grau HPLC, foram comprados da Caledon Laboratories (Georgetown, Canadá).

Tabela 5.1 - Parâmetros do espectrômetro de massas para a RPG, DA-RPG, DC-RPG e RPGd5.

Analito	Tempo de Retenção (min)	Q1 (*m/z*)	Q3 (*m/z*)	EC*(v)	*S lens*
RPG	1,1	453	230	27	131
DA-RPG	0,8	385	292	33	69
DC-RPG	1,2	485	262	18	10
RPGd5**	1,1	458	162	20	131

* Energia de colisão; ** Padrão interno; Q1 = primeiro quadrupolo; Q3 = terceiro quadrupolo.

5.3.3. Microextração em fase sólida empregando o sistema *multiblade*

5.3.3.1. Equipamentos e materiais

A estação de extração *SPME Multi-sampler* (Figura 1.5 C, Capítulo 1) é um protótipo da Professional Analytical System Technology (Magdala, Alemanha). O cubo de polipropileno com 96 poços (*Polypropylene Nunc U96 deep well pate*) foi comprado da VWR Internacional (Mississauga, Canadá). Os *coatings* (fases extratoras) empregados nos *blades* foram C18-PAN (octadecil-sílica e poliacrilonitrila), PBA-PAN (ácido fenilborônico e poliacrilonitrila) e PS-DVB-PAN (benzeno divinil-poliestireno com um fraco trocador iônico e poliacrilonitrila), produzidos no próprio laboratório com matéria prima cedida pela Supelco (Bellefonte, EUA). Empregaram-se também os *coatings* Mixmode-PAN (octadecil-sílica, ácido benzenosulfônico e poliacrilonitrila) e LC-DIOL-PAN (Sílica diol e poliacrilonitrila) produzidos e cedidos pela Supelco (Bellefonte, EUA).

5.3.3.2. Reagentes e solventes

Acetato de sódio e ácido acético (grau P.A.) para o preparo da solução tampão fosfato foram comprados da Sigma-aldrich (St. Louis, EUA); metanol e acetonitrila (grau HPLC) foram comprados da Caledon Laboratories (Georgetown, Canadá).

5.3.3.3. Composição da matriz

Matriz livre

Algumas etapas da otimização do procedimento SPME foram realizadas em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1}, pH 7,4, o que caracteriza a matriz livre (sem os componentes da reação de metabolização, como enzimas e microssomas).

Matriz microssomal

Outras etapas da otimização do procedimento de extração, como a avaliação do tempo de extração, foram conduzidas na matriz microssomal. Cada mL da matriz microssomal tem a seguinte composição média: 712 µL de água purificada, 200 µL de tampão fosfato de sódio 0,5 mol L^{-1}, pH 7,4, 50 µL da Solução A (NADP), 10 µL da Solução B (glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase) e 25 µL de microssomas humanos na concentração de 20 mg de proteína mL^{-1}. Todos os reagentes acima foram obtidos da BD Biosciences (Mississauga, Canadá).

5.3.3.4. Otimização do procedimento da extração por SPME/THFME

Para a otimização da SPME/TFME, 0,1 mL da matriz microssomal ou livre fortificadas com 5 µL das soluções-padrão da RPG, DA-RPG e DC-RPG, na concentração de 25 ng mL^{-1}, foram adicionados nos poços do cubo de polipropileno. Com o intuito de mimetizar as possíveis condições de incubação, as amostras foram submetidas a banho térmico por 15 min a 37 °C e, em seguida, 40 µL de ácido perclórico 6% (v/v) foi adicionado. O pH da amostra foi então ajustado com a adição de 860 µL de um tampão apropriado, totalizando 1 mL de amostra. Feitos os ajustes das amostras, os *blades* (previamente condicionados com metanol:água (50/50, v/v) por 30 min) foram mergulhados nas amostras e a extração foi realizada. Em seguida, os *blades* foram lavados com 2 mL de água purificada por 15 segundos e então os mesmos foram mergulhados nos solventes de dessorção (1 mL). Após a dessorção, os cubos de polipropileno podem ser levados diretamente ao autoinjetor e os blades necessitam ser lavados com ACN:água (50/50, v/v) para que não haja *carry over* para as futuras extrações. A Tabela 5.2 mostra os pontos avaliados para cada parâmetro avaliado na otimização da SPME/TFME.

Tabela 5. 2 - Parâmetros avaliados na otimização da SPME/TFME para análise da RPG, DA-RPG e DC-RPG em meio microssomal.

Parâmetro	**Pontos avaliados**
Coating	C18-PAN, Mixmode-PAN, PS-DVB-PAN, LC-DIOL-PAN e PBA-PAN.
pH da amostra	pH 3 ajustado com 860 µL de tampão acetato de sódio 1 mol L^{-1}, pH 3,1;
	pH 5 ajustado com 860 µL de tampão acetato de sódio 1 mol L^{-1}, pH 5,4;
	pH 7,4 ajustado com 860 µL de tampão fosfato de sódio 1 mol L^{-1}, pH 7,6.
Tempo de extração*	10, 20, 40, 60, 90 e 120 min.
Solvente de dessorção	ACN:água (80/20, v/v);
	ACN:água (50/50, v/v);
	ACN:água (40/60, v/v);
	ACN:água (50/50, v/v) com 0,1% de Ác. acético;
	Metanol:água (50/50, v/v);
	Metanol:água (60/40, v/v).
Tempo de dessorção*	30, 60, 90 e 120 min.
Lavagem*	30 min com ACN:água (50/50, v/v);
	30 min com metanol:água (50/50, v/v).

***** agitados a 1500 rpm.

5.3.4. Validação do método

As soluções padrão utilizadas na validação do método foram preparadas em metanol grau HPLC (Caledon Laboratories, Georgetown, Canadá) nas concentrações de 39, 78, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 e 20000 ng mL^{-1} para RPG e 39, 78, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 e 10000 ng mL^{-1} para DA-RPG e DC-RPG. As soluções foram armazenadas a temperatura de -30 °C.

As curvas analíticas para a avaliação da linearidade do método foram preparadas em triplicata fortificando 100 µL da matriz microssomal (*descrita no íten 5.3.3.3*) com 5 µL das soluções-padrão, alcançando concentrações finais de 2, 3,9, 7,8, 15,6, 31,3, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 ng mL^{-1} para RPG e 2, 3,9, 7,8, 15,6, 31,3, 62,5, 125, 250 e 500 ng mL^{-1} para DA-RPG e DC-RPG. Em seguida, as amostras foram submetidas ao procedimento de

microextração e analisadas por LC-MS-MS. A melhor relação entre os pontos foi obtida através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e ponderação por $1/x^2$.

A estabilidade dos analitos foi avaliada (1) expondo-os sobre a bancada por 12 horas à temperatura ambiente (25 °C±2), (2) submetendo-os à incubação (37 °C por 60 min) na ausência do sistema de regeneração NADPH, (3) ciclos de congelamento e descongelamento (24 e 48 h) e (4) 24 h no autoinjetor a 5 °C. Para estes testes foram avaliadas amostras contendo concentrações de 6 e 350 ng mL^{-1} dos metabólitos da RPG e 6 e 700 ng mL^{-1} do fármaco. Os valores das áreas dos picos cromatográficos foram comparados com valores obtidos de amostras frescas preparadas no momento da análise através do E% (erro relativo).

O limite de quantificação, a recuperação e a precisão e exatidão intradia foram avaliados empregando o procedimento descrito *no item 2.3.4 (Capítulo 2)* e a interferência da matriz na ionização dos analitos na fonte ESI foi avaliada segundo o procedimento descrito no *item 4.3.4.3 (Capítulo 4)*. Nesses experimentos, o volume empregado das amostras foi de 100 µL. As concentrações empregadas na avaliação desses parâmetros são mostradas na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Parâmetros da validação do método de análise da RPG, DA-RPG e DC-RPG.

Parâmetros	**Concentrações avaliadas em ng mL^{-1}**		
	RPG	**DA-RPG**	**DC-RPG**
Limite de quantificação *(n=5)*	2	2	2
Recuperação *(n=3)*	6, 350 e 700	6, 125 e 350	6, 125 e 350
Precisão e exatidão *(n=5; 3 dias*)*	6, 350 e 700	6, 125 e 350	6, 125 e 350
Efeito da matriz *(n=3)*	6	6	6

n número de replicatas; * quantidade de dias relativos à precisão e exatidão inter dias.

Por fim, com a finalidade de avaliar a capacidade do procedimento de preparação da amostra em eliminar interferentes, foram analisados “brancos” de microssomas de fígado de humanos sem a adição dos analítos.

5.3.5. Estudo de metabolismo *in vitro* da RPG

5.3.5.1. Equipamentos, reagentes e solventes

O pool de microssomas humanos de 50 doadores, as soluções A e B (NADPH *Regenerating System*) e o tampão fosfato de sódio para uso com enzimas do Citocromo P450 foram comprados da BD Biosciences (Mississauga, Canadá). Para a incubação foi utilizado um banho-maria a 37 °C da VWR Internacional (Mississauga, Canadá). A solução de ácido perclórico 6% para encerrar o metabolismo foi preparada a partir de ácido perclórico 70% da Fisher-Scientific (New Jersey, EUA).

5.3.5.2. Perfil metabólico in vitro da RPG

A Figura 5.2 mostra o fluxograma empregado para o estudo do metabolismo *in vitro* da RPG. O perfil metabólico da RPG foi avaliado variando-se o tempo de incubação (0, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min) e a concentração de proteínas microssomais (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0 mg mL^{-1}).

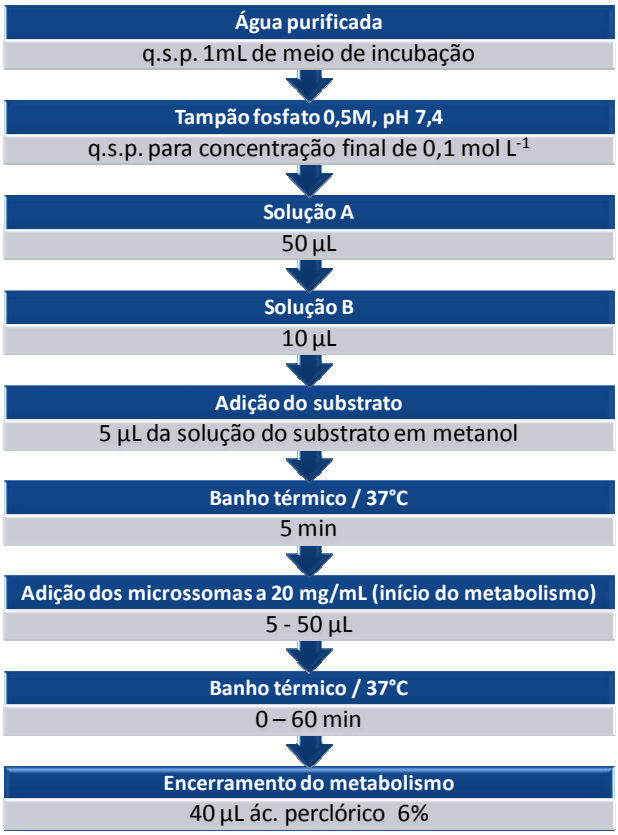


Figura 5.2 - Fluxograma para o estudo de metabolismo *in vitro* da RPG empregando microssomas humanos. Protocolo baseado no Mammalian Liver Microsomes Guidelines for Use – BD Biosciences (MAMMALIAN LIVER MICROSOMES, GUIDELINES FOR USE, 2011).

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1. LC-MS-MS

Para a análise da RGP e seus metabólitos foi desenvolvido um método cromatográfico simples e rápido, usufruindo das características estruturais similares dos compostos. A separação parcial dos analitos foi conseguida empregando uma pequena coluna C18, no modo isocrático, e fase móvel constituída por ACN:água (50/50, v/v) e ácido acético a 0,1 %, na vazão de 0,5 mL min^{-1}. O tempo total de análise foi inferior a 2 min (Figura 5.3).

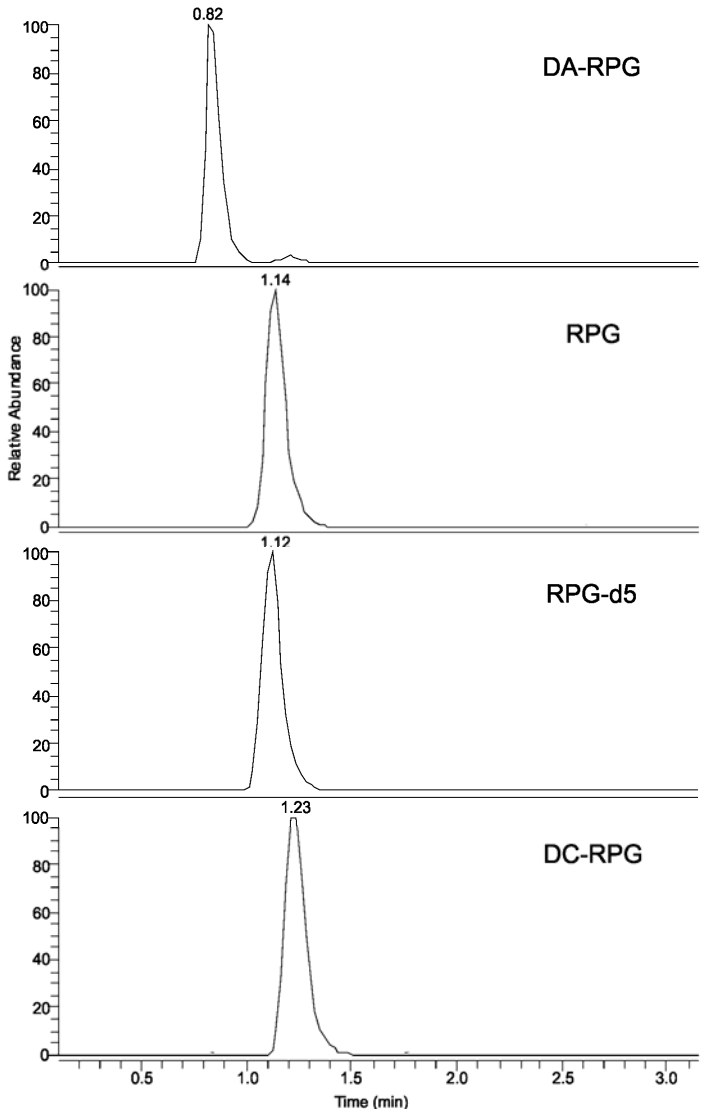


Figura 5.3 - Cromatogramas representativos da análise dos analitos DA-RPG, RPG, DC-RPG e do padrão interno RPG-d5. Condições cromatográficas: coluna C18, fase móvel composta por ACN:água (50/50, v/v) e ácido acético a 0,1 %, vazão de 0,5 mL min^{-1}.

5.4.2. Otimização do procedimento da microextração em fase sólida

De acordo com a Figura 1.6 (*Capítulo 1*), existem muitas variáveis a serem otimizadas na SPME, algumas obrigatórias, outras de importância secundária. De acordo com as características da SPME e da matriz empregada (microssomas humanos), os parâmetros escolhidos para otimização foram: fase extratora, solvente de dessorção, tempo de dessorção, *carry over*, pH da amostra e tempo de extração.

5.4.2.1. Fase extratora e solvente de dessorção

A escolha da fase extratora é um passo crucial na otimização da SPME. Existem na literatura inúmeras fases extratoras para os mais diversos tipos de analitos: polares, apolares, voláteis, etc. (RISTICEVIC et al., 2010). Neste trabalho, foram empregadas as fases extratoras a extração de fármacos e metabólitos em fluídos biológicos: C18-PAN e a Mixmode-PAN, como também, foram avaliadas fases extratoras que estão em fase de desenvolvimento, sendo estas: PBA-PAN, PS-DVB-PAN e LC-DIOL-PAN.

Como apenas a fração livre dos analitos na amostra é extraída por SPME, a avaliação da fase extratora foi realizada em matriz livre, pois, neste momento, a interferência da ligação dos analitos às proteínas microssomais seria igual para todas as fases extratoras. Os experimentos de extração foram realizados em triplicata em matriz livre, com todos os analitos na concentração de 250 ng mL^{-1}. Cada replicata é composta por 100 µL da matriz livre, 40 µL de ácido perclórico 6% e 860 µL de tampão acetato de sódio 1 mol L^{-1}, pH 5,4, ajustando o pH da amostra para 5. Esta sequência de adição de soluções mimetiza o protocolo de metabolismo.

A Figura 5.4 mostra a eficiência da extração das fases extratoras utilizadas empregando diferentes soluções de dessorção. Bons resultados foram obtidos tanto com C18-PAN quanto com Mixmode-PAN. De maneira geral, as soluções dessorventes baseadas em ACN mostraram-se mais eficientes na dessorção dos analitos das fases extratoras. Entretanto, o metanol também foi eficiente para a dessorção dos metabólitos da fase extratora Mixmode-PAN. A boa eficiência de extração da C18-PAN e Mixmode-PAN se justifica pelo fato de que a RPG e seus metabólitos são moléculas relativamente apolares, sendo os metabólitos naturalmente mais polares do que o fármaco. Por uma questão de disponibilidade e conveniência, já que esta é produzida no próprio laboratório, a fase extratora C18-PAN foi escolhida para dar continuidade aos experimentos.

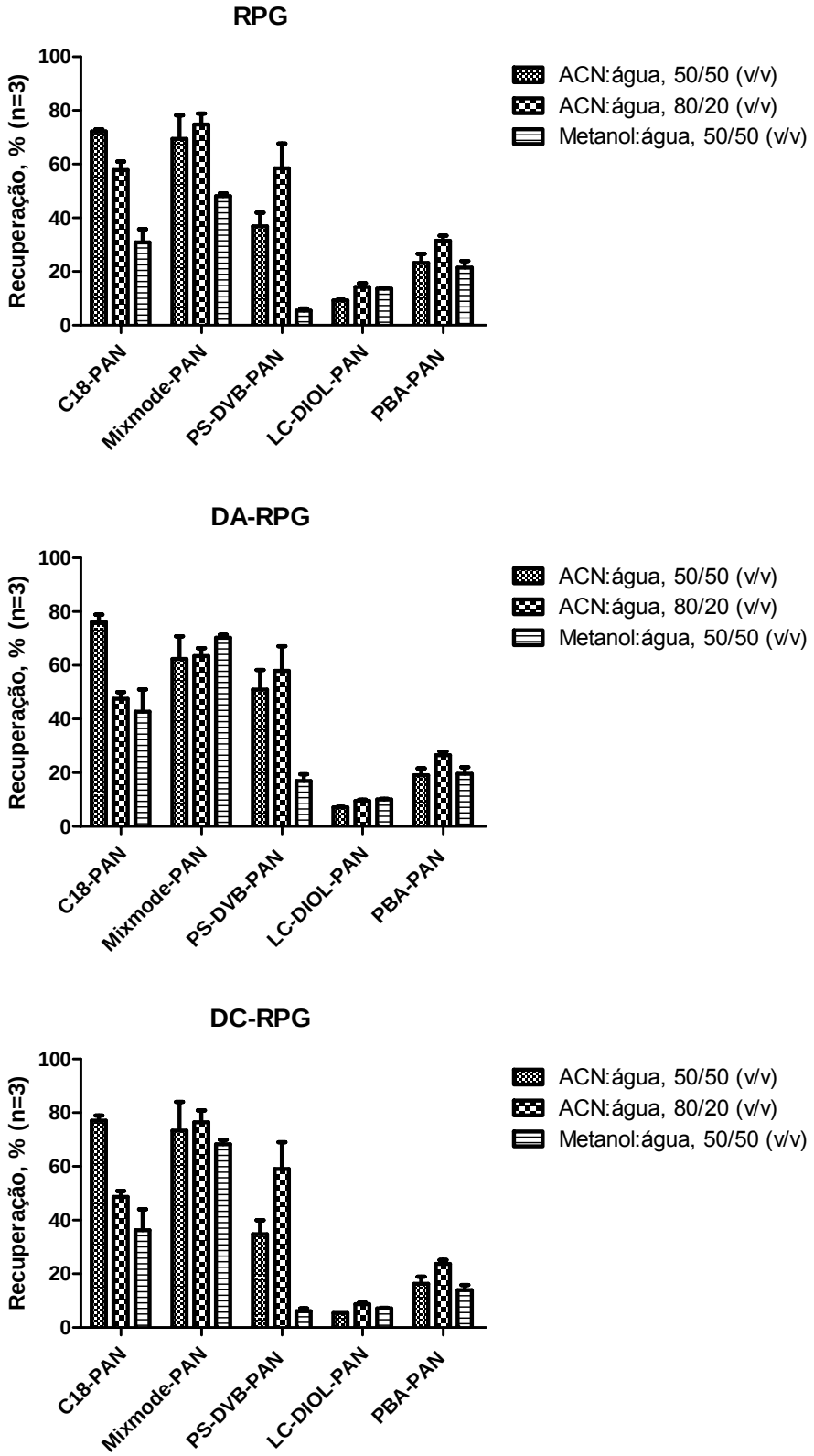


Figura 5.4 - Avaliação das fases extratoras e soluções de dessorção na extração da RPG, DA-RPG e DC-RPG. A extração foi realizada por 120 min sob agitação de ≅ 1500 rpm.

5.4.2.2. Tempo de dessorção e carry over

A otimização do tempo de dessorção é requerida para obter a maior dessorção possível dos analitos dos *blades* e, consequentemente, altas taxas de recuperação e também para minimizar a quantidade de analitos remanescente na fase extratora (*carry over*), para que não haja interferências na reutilização dos *blades* em futuras extrações.

Os ensaios que avaliaram a influência do tempo de dessorção foram realizados em sextuplicata, utilizando 1 mL de ACN:água (50/50, v/v) como solução de dessorção. O volume de 1 mL é requerido para que toda a fase extratora seja banhada pelo solvente de dessorção. As extrações foram realizadas na mesma matriz e concentração dos analitos descritas no *item 5.4.2.1*. A Figura 5.5 mostra o perfil de dessorção da RPG, DA-RPG e DC-RPG em função do tempo.

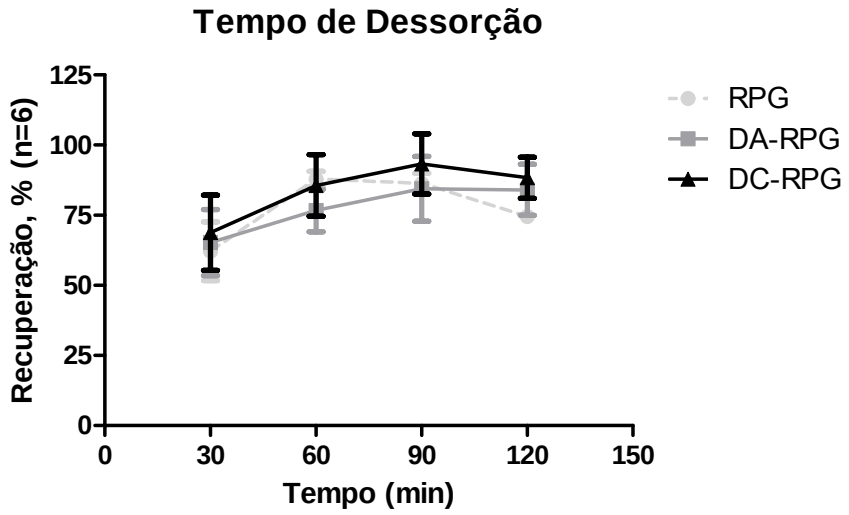


Figura 5.5 - Avaliação do tempo de dessorção da RPG, DA-RPG e DC-RPG. As extrações foram realizadas por 120 min sob agitação de ≅ 1500 rpm.

A Figura 5.5 mostra que o equilíbrio de dessorção ocorre entre 60 e 90 min. A comparação entre os grupos pelo Teste *t* mostra que não há diferença estatística entre os níveis de recuperação ($p > 0,05$) para todos os analitos com 60 ou 90 min de dessorção (Figura 5.6). Portanto, o tempo de 60 min deveria ser utilizado nos experimentos futuros.

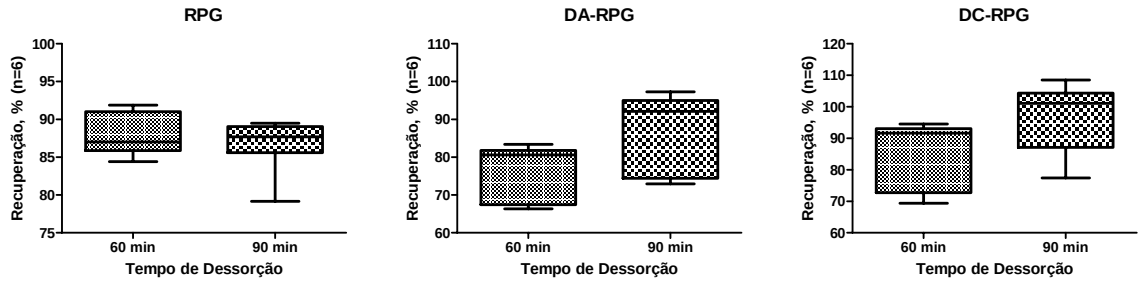


Figura 5.6 - Comparação entre os níveis de recuperação RPG, DA-RPG e DC-RPG após 60 e 90 min de dessorção. Teste t, 95% de intervalo de confiança.

Entretanto, os resultados obtidos nos testes de *carry over* (fazendo uma segunda e terceira dessorção, por 30 min cada, logo após a primeira), mostraram que a dessorção deveria ser feita com o tempo de 90 min pois, aplicando o mesmo teste para comparar a quantidade de analito remanescente nos *blades* (*carry over*) após a dessorção por 60 e 90 min, é possível visualizar claramente (Figura 5.7) a diferença estatística entre os dois grupos (valores de $p<0,05$ para todos os analitos).

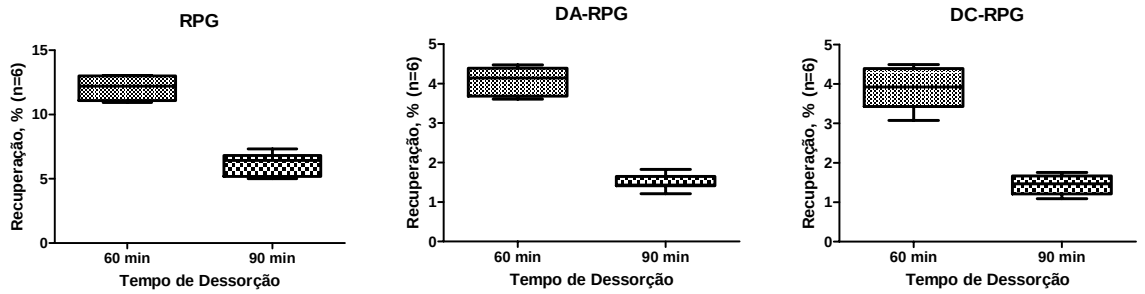


Figura 5.7 - Comparação entre os níveis de *carry over* da RPG, DA-RPG e DC-RPG após 60 e 90 min de dessorção. Teste t, 95% de intervalo de confiança.

A porcentagem dos analitos remanescentes nos *blades* não deve ser superior a 2 % após a dessorção para que as próximas extrações não estejam sujeitas a erros quantitativos. A Figura 5.7 mostra que o *carry over* ficou em torno dos 8 % para a RPG e 2 % para os metabólitos. Na análise das amostras referentes à terceira extração, segundo *carry over*, não foi possível detectar quantidades significativas dos metabólitos da RPG (< de 1 %), mas uma quantidade remanescente de RPG (aproximadamente de 2 a 3 %) foi detectada. Isso mostra a importância de fazer dois ciclos de lavagem com 1 mL de ACN:água (50/50, v/v) por 30 min, para garantir a total remoção dos analitos, em especial da RPG.

Por saber que passos adicionais levam ao consumo de tempo e, portanto, diminuição da taxa de amostragem (número de amostras extraídas por unidade de tempo), uma tentativa

de re-otimização do solvente de dessorção foi realizada. A Tabela 5.4 mostra as diferentes soluções empregadas na tentativa de resolver o problema do *carry over*. Entretanto, os melhores resultados foram obtidos com a solução previamente utilizada (ACN:água (50/50, v/v)). Portanto, a estratégia de utilizar os dois ciclos de lavagem após a dessorção principal foi mantida.

Tabela 5.4 - Solventes de dessorção utilizados na tentativa de aumentar a eficiência da dessorção da RPG, DA-RPG e DC-RPG.

	Recuperação		**1° lavagem**		**2° lavagem**	
	%	DPR(%)	%	DPR(%)	%	DPR(%)
ACN:água, 50/50 (v/v)						
RPG	87	3	7	9	3	3
DA-RPG	76	10	4	10	1	12
DC-RPG	85	12	4	14	2	10
ACN:água 50/50 (v/v), 0,1% de Ác. Acético						
RPG	83	12	7	15	3	10
DA-RPG	79	20	4	10	1	4
DC-RPG	92	19	4	13	2	14
ACN:água, 40/60 (v/v)						
RPG	62	4	16	12	5	14
DA-RPG	76	7	4	16	3	10
DC-RPG	85	6	5	15	2	12
Metanol:água, 60/40 (v/v)						
RPG	115	17	15	21	8	20
DA-RPG	112	24	8	28	4	23
DC-RPG	112	20	6	22	4	21

5.4.2.3. pH da amostra

A RPG comporta-se como uma molécula anfotérica, pois tem um grupo levemente básico (pKa = 6,0) e outro levemente ácido (pKa = 4,1) (SCIFINDER, 20120) e o ponto isoelétrico é por volta do pH 5. Por essa razão, os experimentos vinham sendo conduzidos neste pH. Entretanto, as características ácido-base dos metabólitos em questão não são bem conhecidas. A fase extratora C18-PAN tem maior afinidade por moléculas neutras e, portanto,

a avaliação do pH onde o equilíbrio esteja deslocado em favor das moléculas sem carga pode favorecer a extração.

Foram realizadas extrações em quadruplicata de 0,1 mL de matriz livre adicionada de 40 µL de ácido perclórico e o pH final foi ajustado para 3 (com a adição de 860 µL de tampão acetato de sódio 1 mol L^{-1}, pH 3,1), para 5 (com a adição de 860 µL de tampão acetato de sódio 1 mol L^{-1}, pH 5,4) e para 7,4 (com a adição de 860 µL de tampão fosfato de sódio 1 mol L^{-1}, pH 7,6).

O comportamento dos analitos frente à variação de pH mostra que as maiores taxas de recuperação dos analitos ocorrem em pHs diferentes (Figura 5.8). Como o objetivo do trabalho é o estudo do metabolismo da RPG monitorando os dois metabólitos alvo, a prioridade deve ser dada a estes. Portanto, o pH 5 continuou a ser o pH empregado nas futuras etapas da otimização.

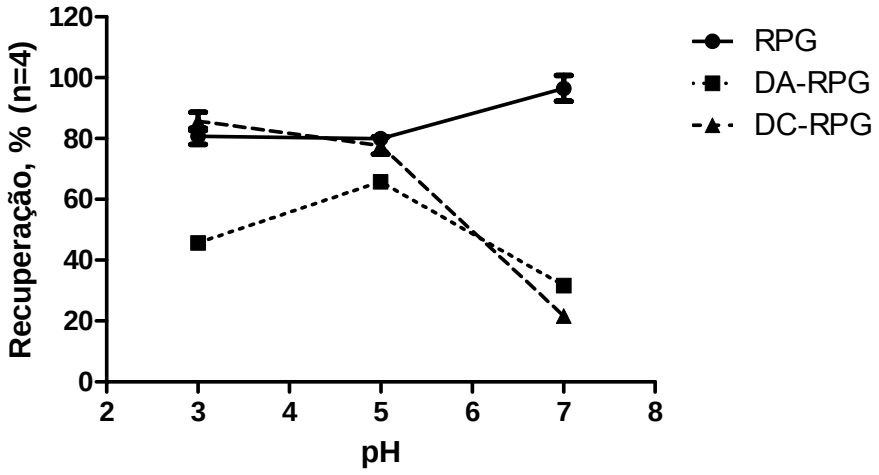


Figura 5.8 - Efeito do pH na eficiência da extração da RPG, DA-RPG e DC-RPG. As extrações e dessorções foram realizadas por 90 min sob agitação de ≅ 1500 rpm.

5.4.2.4. Tempo de extração

A SPME é uma técnica de extração não exaustiva e, portanto, a partir de um determinado tempo de extração, as concentrações dos analitos ficam constantes tanto na matriz quanto na fase extratora (equilíbrio). Dependendo do objetivo analítico do método empregando a SPME, a extração pode ser interrompida antes de o equilíbrio ser atingido. Neste caso, ganha-se em tempo mas perde-se em recuperação. No presente estudo, o objetivo é atingir os maiores níveis de recuperação possíveis, portanto no platô de equilíbrio.

Para a avaliação do perfil de extração da RPG, DA-RPG e DC-RPG foram feitas extrações em sextuplicata durante 10, 20, 40, 60, 90 e 120 min, tanto na matriz livre quanto

em meio microssomal com 2,5 mg de proteína mL^{-1}. Esta concentração de proteínas é muito acima do que se espera usar nos estudos de metabolismo empregando microssomas humano (normalmente por volta dos 0,5 mg mL^{-1}), mas o objetivo deste experimento, além de descobrir quanto tempo a extração demora em atingir o equilíbrio, é visualizar se a ligação dos analitos às proteínas microssomais modificam o perfil da extração.

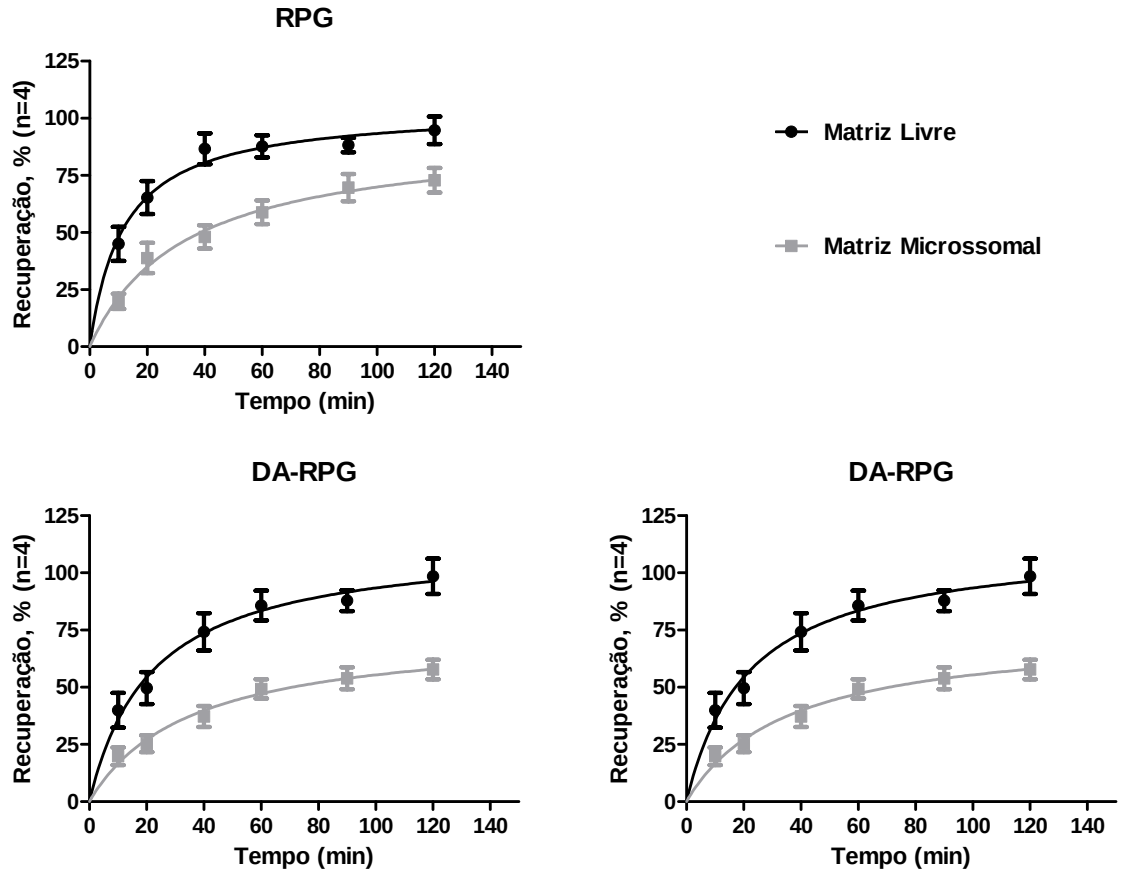


Figura 5.9 - Perfil da extração da RPG, DA-RPG e DC-RPG na matriz livre dos microssomas e no meio microssomal (2,5 mg de proteína mL^{-1}). As extrações foram feitas sob agitação de ≅ 1500 rpm.

Observando a Figura 5.9 é possível perceber que a partir de 60 min a extração tende a atingir o platô (tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido na extração dos analitos). Outro fator importante é que apesar da diminuição da recuperação (comparação entre matriz livre e microssomas) devido à ligação dos analitos às proteínas microssomais, o perfil cinético da extração é semelhante para cada analito com e sem microssomas. Portanto, o tempo de extração definido para os próximos passos foi 60 min.

5.4.2.5. Condições otimizadas

A Tabela 5.5. mostra as condições otimizadas da SPME/TFME.

Tabela 5.5. Condições finais para a extração da RPG, DA-RPG e DC-RPG.

Coating	C18-PAN
Precondicionamento do *coating*	30 min com metanol:água (50/50, v/v)
Tempo de extração	60 min (sob agitação de ≅ 1500 rpm)
Solvente de dessorção	Acetonitrila:água (50/50, v/v)
Tempo de dessorção	90 min (sob agitação de ≅ 1500 rpm)
Lavagem	2 x 30 min com ACN:água (50/50, v/v)

A Figura 5.10 representa o fluxograma de extração dos analitos RPG, DA-RPG e DC-RPG para os estudos de metabolismo *in vitro*. A adição da solução de ácido perclórico 6% (v/v) tem por finalidade parar o metabolismo e além disso, promove a precipitação das proteínas microssomais, liberando o fármaco e metabólitos da matriz.

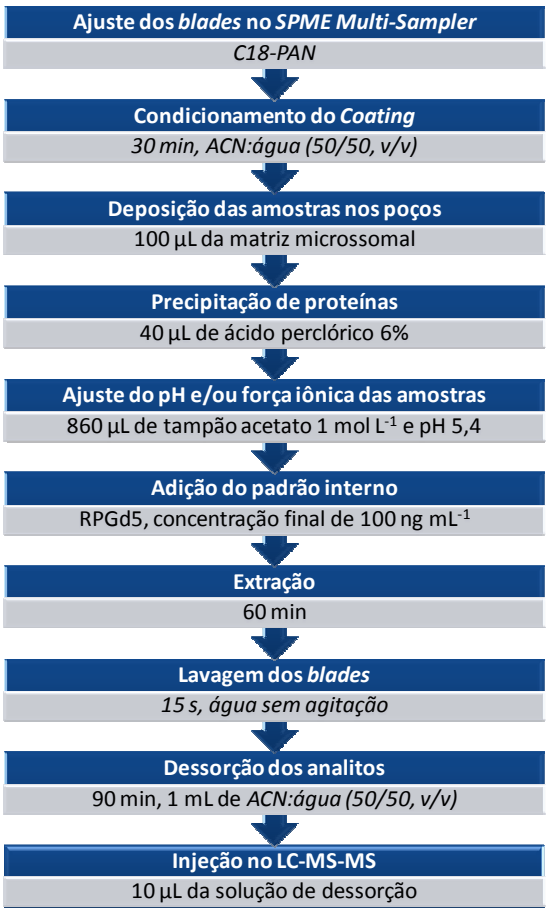


Figura 5.10 - Fluxograma de execução da extração da RPG, DA-RPG e DC-RPG empregando o *SPME Multi-Sampler*.

5.4.3. Validação do método desenvolvido

5.4.3.1. Linearidade e limite de quantificação

A Tabela 5.6 mostra o intervalo de concentrações nos quais o método mostrou-se linear. Coeficientes de correlação $r > 0,99$ e desvios do valor teórico (E%) de cada replicata de cada ponto da curva analítica menores que 15% foram obtidos para todos os analitos.

Tabela 5.6 - Linearidade do método de análise da RPG, DA-RPG e DC-RPG.

Analitos	Intervalo (ng mL^{-1})	Equação Linear	*r**
RPG	2 – 1000	y = 0,0155x + 0,006	0,9971
DA-RPG	2 – 500	y = 0,0080x + 0,005	0,9920
DC-RPG	2 – 500	y = 0,0106x – 0,001	0,9918

* coeficiente de correlação.

Os limites de quantificação (LOQs) do método validado foram de 2 ng mL^{-1} para todos os analitos. Os valores de CV (%) e E (%) obtidos na avaliação desse parâmetro foram inferiores a 15% (Tabela 5.7).

Tabela 5.7 - Limites de quantificação do método de análise da RPG, DA-RPG e DC-RPG.

Analitos	Concentração Teórica (ng mL^{-1})	Concentração Calculada (ng mL^{-1})	CV(%)*
RPG	2,0	2,0±0,1	4%
DA-RPG	2,0	2,0±0,2	12%
DC-RPG	2,0	2,0±0,1	5%

* coeficiente de variação percentual

O LOQ para a RPG é similar aos encontrados nos melhores métodos bioanalíticos disponíveis para a análise da RPG em fluídos biológicos, 0,4 ng mL^{-1} (PETSALO et al., 2008), 1,0 ng mL^{-1} (HESS; MUSSHOFF; MADEA, 2011) e 2,5 ng mL^{-1} (JIROVSKY et al., 2010). Uma vantagem do método aqui descrito é a obtenção desses baixos LOQ empregando apenas 100 µL de amostra.

5.4.3.2.Recuperação

O procedimento final da SPME/TFME aplicado a 0,1 mL da fração microssomal de fígado de humanos levou a recuperações médias superiores a 90% para todos os analitos, com

valores de CV% iguais ou inferiores a 15 % (Tabela 5.8). A obtenção de altos valores de recuperação foi possível devido ao emprego da SPME na configuração TFME. Pois, como previamente discutido no *íten 1.1.3 (Capítulo 1),* o aumento do volume da fase extratora e da área superficial em contato com as amostras elevam a capacidade de recuperação (características intrínsecas ao TFME).

Tabela 5.8 - Recuperação do método de análise da RPG, DA-RPG e DC-RPG.

Analito	**Microssomas 0,3 mg mL^{-1}**	
(ng mL^{-1}, n = 5)[a]	**Recuperação (%)**	**CV[b](%)**
RPG		
2	85	5
350	95	15
700	93	9
Média	*91*	*6**
DA-RPG		
6	94	13
125	76	6
350	78	11
Média	*83*	*12**
DC-RPG		
6	92	5
125	104	7
350	100	15
Média	*99*	*6**

[a] numero de replicatas; [b] coeficiente de variação percentual; *coeficiente de variação percentual entre as replicatas das três concentrações.

As técnicas empregadas até então para extração da RPG de amostras biológicas tem sido a PP (JIROVSKY et al., 2010; KAUSHAL; JAIN; TIWARY, 2010) e a LLE (JIROVSKY et al., 2010; RUZILAWATI et al., 2007; PETSALO et al., 2008; HESS; MUSSHOFF; MADEA, 2011). Comparando a recuperação da RPG empregando a SPME/TFME com as técnicas de extração relatadas na literatura, é possível concluir que os

valores de recuperação entre elas são semelhantes, entre 90 (RUZILAWATI et al., 2007) e 100% (JIROVSKY et al., 2010; HESS; MUSSHOFF; MADEA, 2011).

5.4.3.3. Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas em ensaios realizados intradia e interdias (Tabela 5.9). Os valores de CV (%) e E (%) foram inferiores a 15%.

Tabela 5.9 - Precisão e exatidão do método de análise da RPG, DA-RPG e DC-RPG.

Analitos *(n=3)*	**Concentração nominal (ng mL^{-1})**	**Concentração Obtida (ng mL^{-1})**	**E(%)**[a]	**CV(%)**[b]
RPG	6,0	5,9	-2%	2%
	350	357	2%	1%
	700	702	1%	1%
DA-RPG	6,0	5,9	-1%	4%
	125	127	-2%	10%
	350	347	-1%	13%
DC-RPG	6,0	5,8	-4%	9%
	125	124	-1%	14%
	350	362	4%	15%

[a] erro relativo percentual; [b] coeficiente de variação percentual; n= número de replicatas para cada concentração.

5.4.3.4. Estabilidade

Para avaliar a estabilidade dos analitos durante todo o processo analítico e do protocolo de metabolismo, amostras microssomais fortificadas com os analitos foram expostas à temperatura ambiente por 12 h (para simular o tempo gasto no preparo das amostras); foram mantidas a 37 °C por 60 min em meio microssomal sem o sistema de regeneração NADPH (para simular as condições de incubação); foram submetidas a ciclos de congelamento de 24h e 48h (simulando o estoque das amostras para posterior análise). A estabilidade das amostras no autoinjetor também foi avaliada mantendo-as por 24h a 5 °C para posterior análise.

Os analitos mostraram-se estáveis nas condições estudadas, pois na comparação com amostras frescas (extraídas e imediatamente analisadas) não foram observados desvios relativos superiores a 11% (Tabela 5.10).

Tabela 5.10 - Avaliação da estabilidade da RPG, DA-RPG e DC-RPG durante o processo analítico.

Analitos	**Desvio do valor nominal (%) em relação a amostras recém preparadas**				
(n = 6)[a]	**Temperatura Ambiente**	**Incubação**	**24h**	**48h**	**Autoinjetor**
RPG					
6,0 ng mL^{-1}	4	1	3	-11	2
700 ng mL^{-1}	1	1	1	2	1
DA-RPG					
6,0 ng mL^{-1}	8	10	-2	-2	11
350 ng mL^{-1}	14	2	-11	-9	1
DC-RPG					
6,0 ng mL^{-1}	6	11	-3	-3	8
350 ng mL^{-1}	15	5	-7	-5	1

[a] número de replicatas em cada concentração.

5.4.3.5. Seletividade e efeito de matriz na ionização dos analitos

Uma das funções primordiais das técnicas de preparação de amostras é extrair os analitos de interesse o mais seletivamente possível (*clean up*), para que interferentes oriundos das amostras não afetem a detecção e quantificação dos analitos de interesse. A Figura 5.11 mostra cromatogramas referentes a extratos obtidos de amostras "brancas" (todos os componentes do meio de incubação, com exceção da RPG, DA-RPG e DC-RPG). É possível verificar que não há nenhuma variação significativa na linha de base durante todo o período de análise.

Apesar dos detectores MS serem bastante seletivos, em especial no modo MS-MS, interferentes da matriz que coeluam com os analitos alvo podem interferir na ionização destes. Esta interferência afeta a repetibilidade da ionização, com consequente problemas na detecção e quantificação (ANTIGNAC et al., 2005; MATUSZEWSKI, 2006). Portanto, quando se emprega MS como técnica de detecção, é aconselhável a avaliação da possível interferência da matriz na ionização dos analitos de interesse (FDA, 2001).

Para a verificação do poder de *clean up* da técnica de SPME/TFME no que tange a ausência de efeito de matriz na ionização dos analitos, foram feitas comparações de amostras

"brancas" extraídas e, em seguida, fortificadas com os analitos, com padrões dos analitos na fase móvel nas mesmas concentrações. Analisando a Tabela 5.11 pode-se concluir que não há efeito da matriz na ionização do fármaco e seus metabólitos que possa interferir de maneira significativa na quantificação da RPG, DA-RPG e DC-RPG em amostras reais, já que, a diferença entre os dois grupos foi ≤ 12% para todos os analitos.

Tabela 5.11 - Efeito da matriz na ionização da RPG, DA-RPG e DC-RPG.

Analito	Desvio em relação aos analitos na fase móvel (%)	CV (%)[a]
RPG	10	9
DA-RPG	12	7
DC-RPG	0	8

[a] coeficiente de variação em porcentagem; n=3.

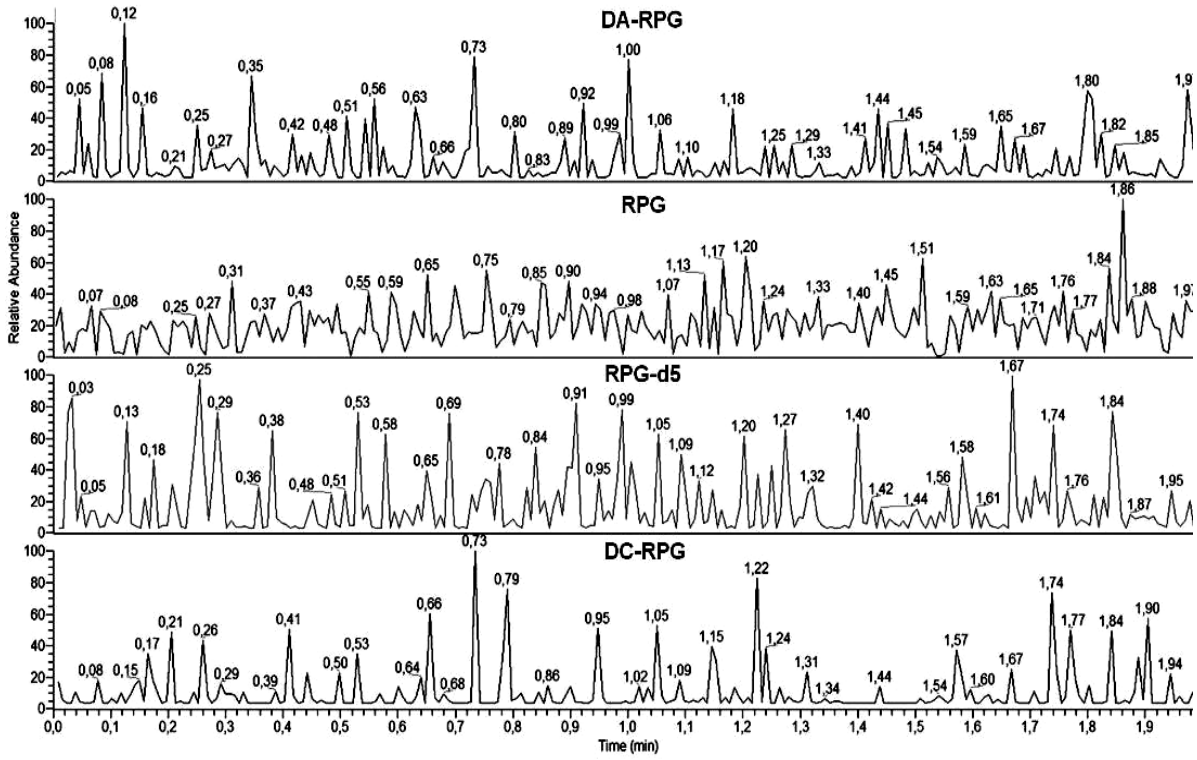


Figura 5.11 - Cromatogramas representativo do extrato de amostras "brancas". Condições cromatográficas: coluna C18, fase móvel composta por ACN:água (50/50, v/v) e ácido acético a 0,1%, vazão de 0,5 mL min^{-1}.

5.4.4. Estudo do metabolismo *in vitro* da repaglinida

O método analítico validado foi empregado em um estudo de metabolismo *in vitro* da RPG empregando *pool* de microssomas de 50 doadores . O perfil metabólico *in vitro* da RPG foi avaliado frente à variação do tempo de incubação e da concentração de proteínas microssomais.

Primeiramente, a RPG foi submetida ao metabolismo *in vitro* variando-se o tempo de incubação (no intervalo de 0 a 60 min a 37 °C). Os experimentos foram realizados em triplicata com uma concentração de 0,5 mg de proteína microssomal mL^{-1} no meio de incubação. A concentração nominal inicial da RPG foi de 850 ng mL^{-1}. Um grupo controle, sem adição de microssomas, incubado nas mesmas condições por 60 min, também foi avaliado para garantir que os metabólitos formados foram oriundos do metabolismo microssomal. A Figura 5.12 mostra o decaimento da concentração da RPG em função do tempo, com consequente surgimento dos metabólitos DA-RPG e DC-RPG. Após 30 min, tanto o metabolismo da RPG quanto o surgimento dos metabólitos tendem a alcançar o platô. Os metabólitos DA-RPG e DC-RPG já foram relatados anteriormente por Bidistrup et al. (2003). Segundo estes pesquisadores, as enzimas que catalisam a formação desses metabólitos a partir da RPG são as isoformas CYP2C8 e CYP3A4.

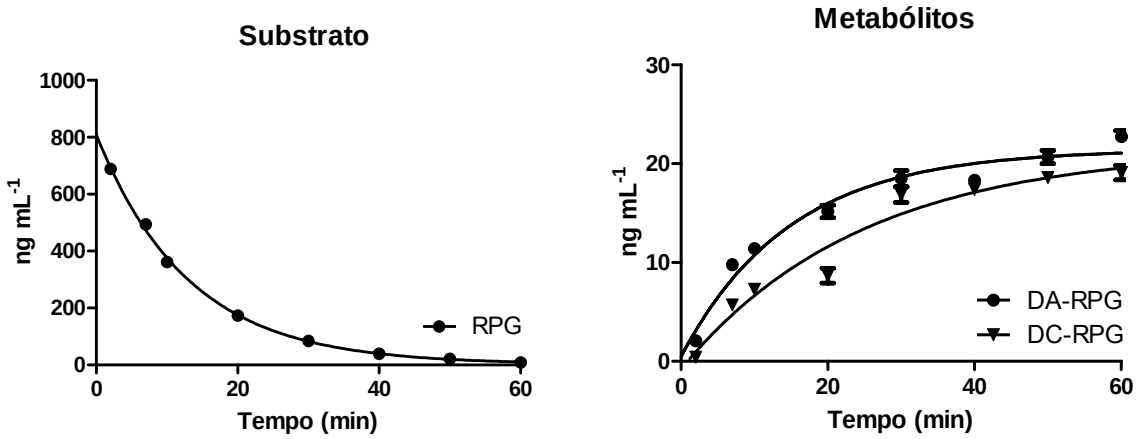


Figura 5.12 - Avaliação do metabolismo da RPG em função do tempo.

Outro experimento foi realizado com o intuito de avaliar a influência da concentração de proteínas microssomais no perfil metabólico da RPG. Para este fim, a RPG foi submetida a incubações em diferentes concentrações de proteínas microssomais (0 a 1 mg mL^{-1}) por 10 min. Da mesma forma que nos experimentos de tempo de incubação, os testes envolvendo a

variação da concentração protéica foram realizados em triplicata e com um grupo controle, sem adição de microssomas. A Figura 5.13 mostra o decaimento da concentração do fármaco e o aumento da concentração dos metabólitos.

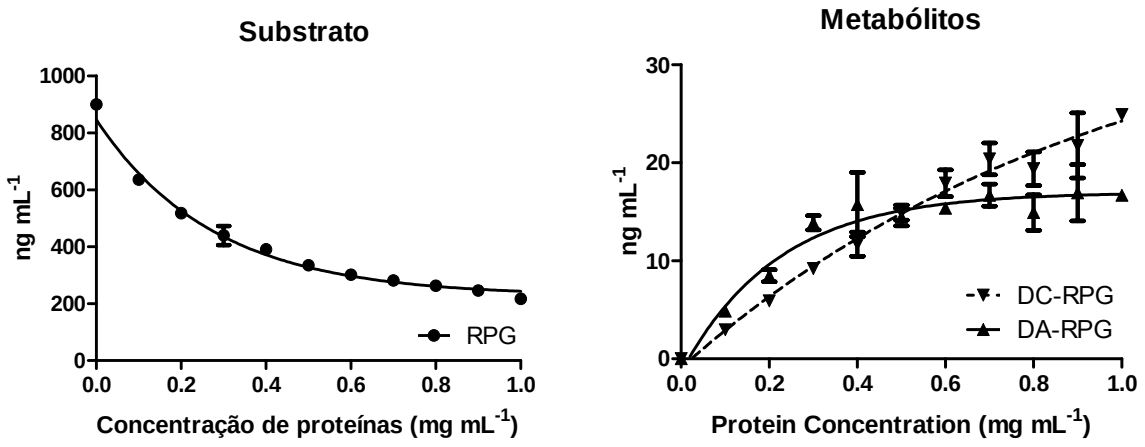


Figura 5.13 - Avaliação do metabolismo da RPG em função da concentração de proteínas.

A concentração de proteínas é um indicador da concentração das enzimas metabolizadoras, sendo o aumento da concentração destas enzimas mais significante para a formação da DC-RPG, se comparado ao outro metabólito monitorado, DA-RPG.

5.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresenta dados oriundos da otimização e validação de um método analítico empregando a SPME/TFME na configuração *multiblade* e o LC-MS-MS, com o intuito de avaliar o potencial do emprego desta técnica em estudos de metabolismo *in vitro*, particularmente o da RPG.

Empregando a técnica LC-MS-MS, foi desenvolvido um método rápido (2 min) para análise simultânea da RPG, DA-RPG e DC-RPG. Esse é o primeiro método descrito para análise simultânea desse fármaco e de seus metabólitos. Somado a isso, a SPME/TFME executada utilizando o protótipo de custo reduzido (*SPME Multi-sampler)*, possibilitou o processamento de até 96 amostras simultaneamente, levando a taxa de 1 amostra a cada 5 min, incluindo a etapa de preparação das amostras e as corridas cromatográficas. Os valores de recuperação obtidos mostram-se superiores a 90% para todos os analitos, o que é difícil de ser alcançado quando se trata de técnicas miniaturizadas de preparação de amostras.

O método validado foi aplicado em um estudo de metabolismo *in vitro* da RPG empregando microssomas humanos. Os dois metabólitos monitorados foram formados, sendo que o perfil de formação destes depende diretamente do tempo de incubação e da concentração de proteínas microssomais.

O método analítico desenvolvido mostrou-se adequado à finalidade proposta. Além disso, a SPME/TFME realizada com o auxílio do *SPME Multi-sampler* apresentou um grande potencial para aplicações em estudos de metabolismo *in vitro* empregando microssomas, pois: (1) tanto as etapas do metabolismo quanto as de preparo das amostras podem ser feitas sequencialmente no mesmo recipiente (*96 well plate*), diminuindo a possibilidade de introdução de erros no método analítico; e (2) possibilidade da avaliação de diferentes parâmetros simultaneamente, tanto do metabolismo quanto da extração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTIGNAC, J. P.; DE WASCH, K.; MONTEAU, F.; DE BRABANDER, H.; ANDRE, F.; LE BIZEC, B. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. **Analytica Chimica Acta,** v. 529, p. 129–136, 2005.

BIDSTRUP, T. B.; BJØRNSDOTTIR, I.; SIDELMANN, G. U.; THOMSEN, M. S.; HANSEN, K. T. CYP2C8 and CYP3A4 are the principal enzymes involved in the human in vitro biotransformation of the insulin secretagogue repaglinide. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 56, p. 305–314, 2003.

FDA. United States Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (2001), http://www.fda.gov/Drugs/Guidance ComplianceRegulatory Information/Guidances/default.htm. Acesso em 30 de outubro de 2011.

FUHLENDOR, J.; RORSMAN, P.; KOFOD, H.; BRAND, C.L.; ROLIN, B.; MACKAY, P.; SHYMKO, R.; CARR, R. D. Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes. **Diabetes**, v. 47, p. 345-351, 1998.

HESS, C.; MUSSHOFF, F.; MADEA, B. Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography–mass spectrometry**. Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p.33–41, 2011.

JIROVSKY, D.; BARTOSOVA, Z.; SKOPALOVA, J.; MAIER, V . Electrochemical characterization of repaglinide and its determination in human plasma using liquid chromatography with dual-channel coulometric detection. **Journal of Chromatography B** v. 878, p. 3243-3248, 2010.

KAUSHAL, N.; JAIN, S.; TIWARY, A. K. Development of spectrofluorimetric and hplc methods for *in vitro* analysis of repaglinide. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, p. 240-244, 2010.

MAMMALIAN LIVER MICROSOMES, GUIDELINES FOR USE. **BD Bioscience.** Disponível em: http://www.bdbiosciences.com/external_files/dl/doc/manuals/live/web_ enabled/ adme_mammalian_liver_microsomes.pdf. Acessado em 10 dezembro de 2011.

MATUSZEWSKI, B. K. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC–MS bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 830, p. 293–300, 2006.

NATTRASS, M.; LAURITZEN, T. Review of prandial glucose regulation with repaglinide: a solution to the problem of hypoglycaemia in the treatment of Type 2 diabetes? **International Journal of Obesity**, v.24, p. S21–S31, 2000.

PETSALO, A.; TURPEINEN, M.; PELKONEN, O; TOLONEN, A. Analysis of nine drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites from urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry utilizing sub 2 mu m particle size column. **Journal of Chromatography A,** v.1215, p.107-115, 2008.

RISTICEVIC, S., LORD, H.L., GORECKI, T., ARTHUR, C.L. PAWLISZYN, J. Protocol for solid phase microextraction method development. **Nature Protocols**, v. 5, p. 122–139, 2010.

RUZILAWATI, A. B; WAHAB, M. S. A.; IMRAN, A.; ISMAIL, Z.; GAN, S. H. Method development and validation of repaglinide in human plasma by HPLC and its application in pharmacokinetic studies. Journ**al of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 1831-1835, 2007.

SCIFINDER. Versão online do SciFinder. Disponível em : https://scifinder.cas.org. Acesso em 17 de janeiro de 2012.

TRONIER, B.; MARBURY, T. C.; DAMSBO, P. A new oral hypoglycemic agent, repaglinide minimizes risk of hypoglycemia in well-controlled NIDDM patients. **Diabetologia**, v. 38, p. A195–A195, 1995.

Capítulo 6

CONCLUSÕES GERAIS

Três diferentes técnicas de microextração foram empregadas no desenvolvimento dos métodos bioanalíticos enantiosseletivos para análise da ISR e PDI, dos metabólitos 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF e da RNZ e DRNZ em frações microssomais de fígados de ratos, e um método não-enantiosseletivo para análise da RPG, DA-RPG e DC-RPG em meio microssomal hepático de humanos.

A HF-LPME executada no modo duas-fases mostrou resultados satisfatórios para a extração dos analitos neutros ISR e PDI, com recuperações em torno de 20%. Para a extração do 1'-Oxo-BF e 1'-OH-BF, por serem fracamente básicos e, portanto, ionizáveis, foi empregada a HF-LPME no modo três-fases, que permitiu obter recuperações excelentes, em torno de 65% para todos os analitos. Isto é coerente com a teoria geral da HF-LPME, pois no modo duas-fases os analitos são extraídos para um volume muito pequeno de solvente orgânico (apenas 35 µL para extração da ISR e PDI) até que o equilíbrio seja atingido. Mas, quando se trata do modo três-fases, os analitos são extraídos na forma não ionizada para o solvente orgânico impregnado nos poros da membrana e, em seguida, são "aprisionados" na forma ionizada na solução aquosa que preenche o lúmen da membrana cilíndrica, pois esta solução tem pH oposto ao da fase doadora. Portanto, este deslocamento de equilíbrio dos analitos da fase orgânica para a aquosa favorece maiores taxas de recuperação. A HF-LPME na configuração empregada nesse estudo mostrou-se uma técnica bastante útil para a análise dos fármacos e metabólitos propostos. Isto se deve a vários pontos, entre eles: baixo consumo de solventes orgânicos com conseqüente menor agressão ao meio ambiente; alto *clean-up*, característica muito desejável quando se trabalha com matrizes complexas; possibilidade de realização dos experimentos de metabolismo *in vitro* e extração das amostras no mesmo tubo de ensaio; e possibilidade de realizar 36 extrações ao mesmo tempo.

Pela primeira vez a DLLME foi empregada para a extração de fármacos de meio microssomal, com aplicação em estudos de metabolismo *in vitro*. No caso particular desta

tese, os analitos extraídos por esta técnica foram o fármaco RNZ e seu metabólito DRNZ. Esta técnica mostrou-se muito interessante para estudos de metabolismo *in vitro*, pois ela possibilitou o encerramento das reações de metabolismo, extração e concentração dos analitos em uma única etapa, economizando tempo durante análises de rotina. Outras duas grandes vantagens da DLLME na extração da RNZ e DRNZ foram a simplicidade e velocidade, pois o único equipamento necessário foi uma centrífuga e o tempo despendido para a extração foi somente o necessário para a adição da solução extratora em cada tubo contendo as amostras e a centrifugação. Desta forma, foi possível preparar até 24 amostras a cada 10 minutos. Com valores de recuperação em torno de 55% para os enantiômeros da RNZ e 45% para os da DRNZ, simplicidade, velocidade e baixo custo, a DLLME mostrou-se uma técnica bastante interessante para o estudo proposto.

Finalmente, a SPME/TFME foi empregada para a extração dos analitos anfóteros RPG, DA-RPG e DC-RPG de meio microssomal hepático de humanos. Empregando o equipamento *SPME Multi-sampler* foi possível a preparação de até 96 amostras simultaneamente com altíssima eficiência na extração, pois recuperações entre 83 e 99% foram alcançadas. Este tipo de aplicação da SPME é inédito em todos os aspectos, desde a extração direta de analitos de matrizes microssomais até o emprego da estação *SPME Multi-sampler*.

Para a análise de todos os fármacos e metabólitos empregou-se a técnica HPLC com detecção UV ou MS. A HPLC-UV utilizando colunas com fases estacionárias quirais mostrou-se uma técnica analítica bastante adequada para a análise simultânea do PDI e dos enantiômeros da ISR, com tempo de análise inferior a 12 min. Também os dois enantiômeros do 1'-Oxo-BF e os 4 estereoisômeros do 1'-OH-BF foram resolvidos e quantificados numa mesma corrida cromatográfica (com tempo de análise inferior a 18 min), tornando ambas as metodologias muito úteis para estudos futuros que necessitem de uma separação cromatográfica destas substâncias.

Para a análise dos enantiômeros da RNZ e DRNZ utilizou-se o LC-MS-MS com coluna quiral em fase normal, com tempo de análise de 15 min. Para a análise não quiral da RPG e seus metabólitos DA-RPG e DC-RPG também foi empregado o LC-MS-MS, com uma pequena coluna C18, permitindo um tempo total de análise cromatográfica inferior a 2 min. O uso de LC-MS-MS foi particularmente interessante para a obtenção de baixos limites de quantificação (25 ng mL^{-1} para os enantiôemros da RNZ, 10 ng mL^{-1} para os enantiômeros da DRNZ e 2 ng mL^{-1} para a RPG e seus metabólitos).

A aplicação comum a todos os métodos bioanalíticos desenvolvidos foi o estudo de metabolismo *in vitro* dos fármacos empregando microssomas hepáticos de ratos (ISR, BF e RNZ) e de humanos (RPG). Com o emprego das metodologias desenvolvidas foi possível contribuir com novos dados do metabolismo dos fármacos escolhidos, em particular da ISR, pois não existe na literatura dados referentes à cinética enzimática para os diferentes enantiômeros, e para a RNZ, para a qual foi sugerido, de forma inédita, um metabolismo enantiosseletivo.