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.
164 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: _____

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.*

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).

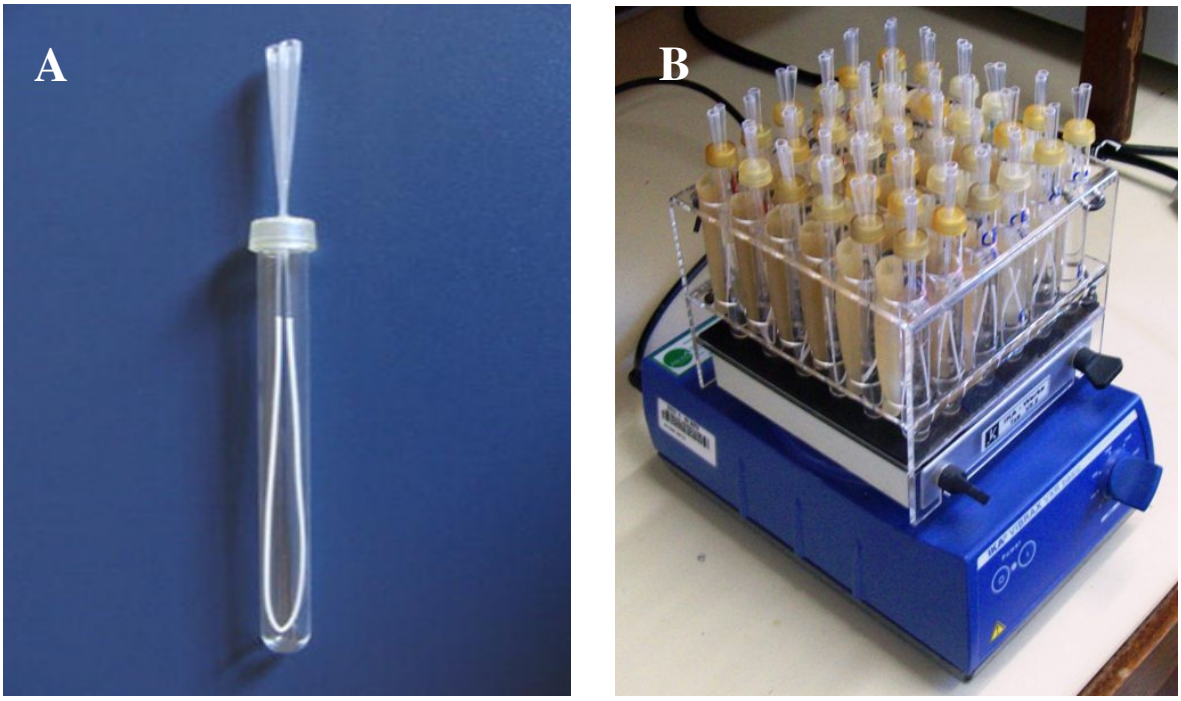

Figura 1.1 - Sistema da HF-LPME empregado neste trabalho. A) Unidade extratora da HF-LPME, composta por um seguimento de membrana cilíndrica oca fixada com suas extrimades fixadas à duas ponteiras plásticas e ajustada a um tubo de vidro (Adaptado de Magalhães e Bonato, (2009)). B) Equipamento (Vibrax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

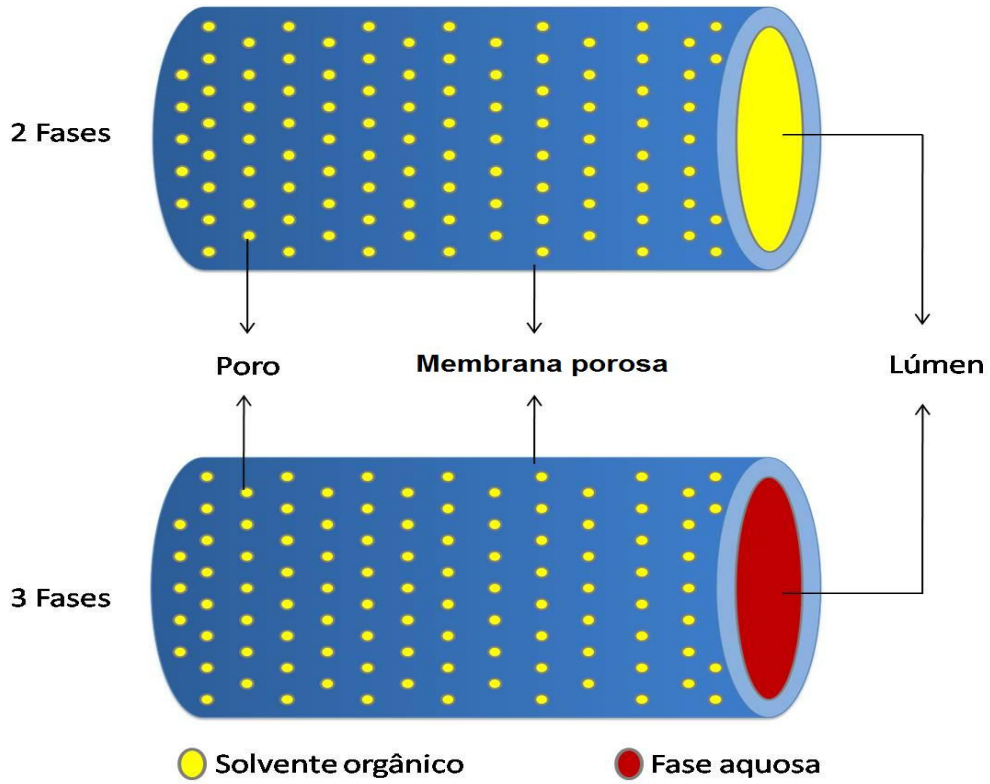

Figura 1.2 - Ilustração da HF-LPME.

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.

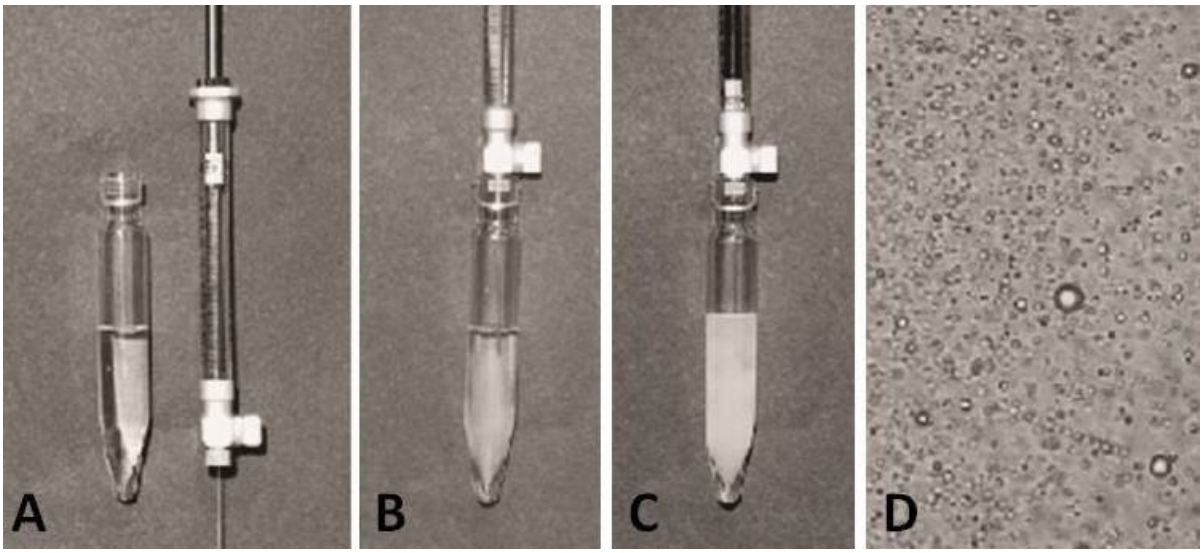

Figura 1.3 - Fotografia de diferentes etapas da DLLME. A) antes da injeção da mistura do solvente extrator e dispersante na amostra; B) início da injeção; C) fim da injeção; D) microscopia óptica (100x). Adaptado de (REZAEE et al., 2006).

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.

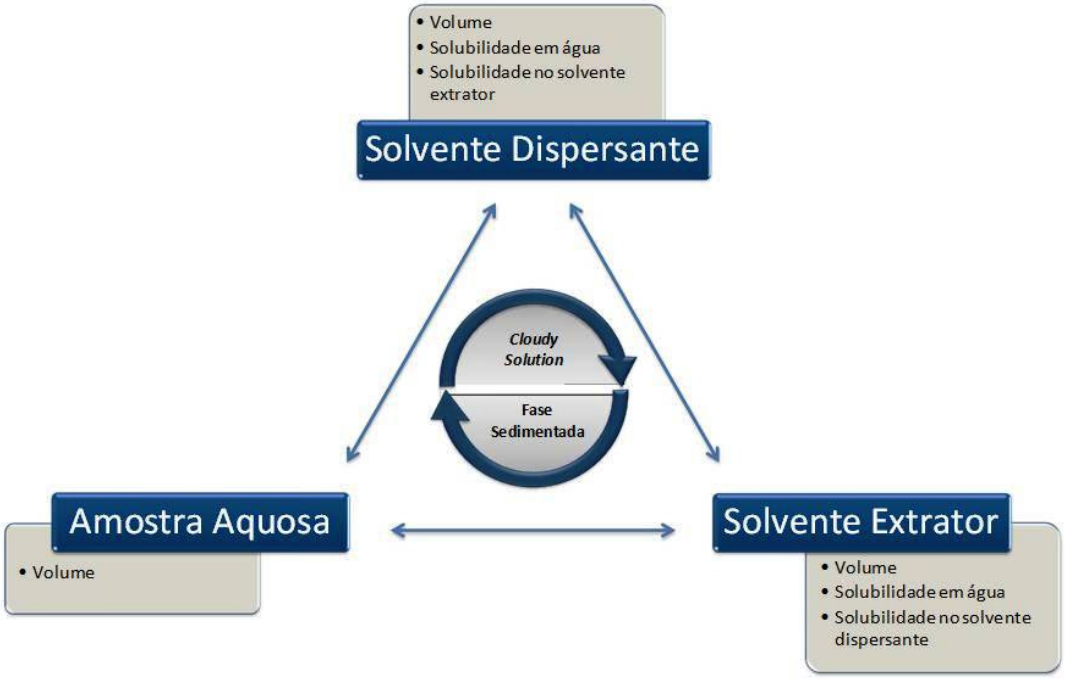

Figura 1.4 - Principais variáveis que influenciam a eficiência da DLLME.

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.

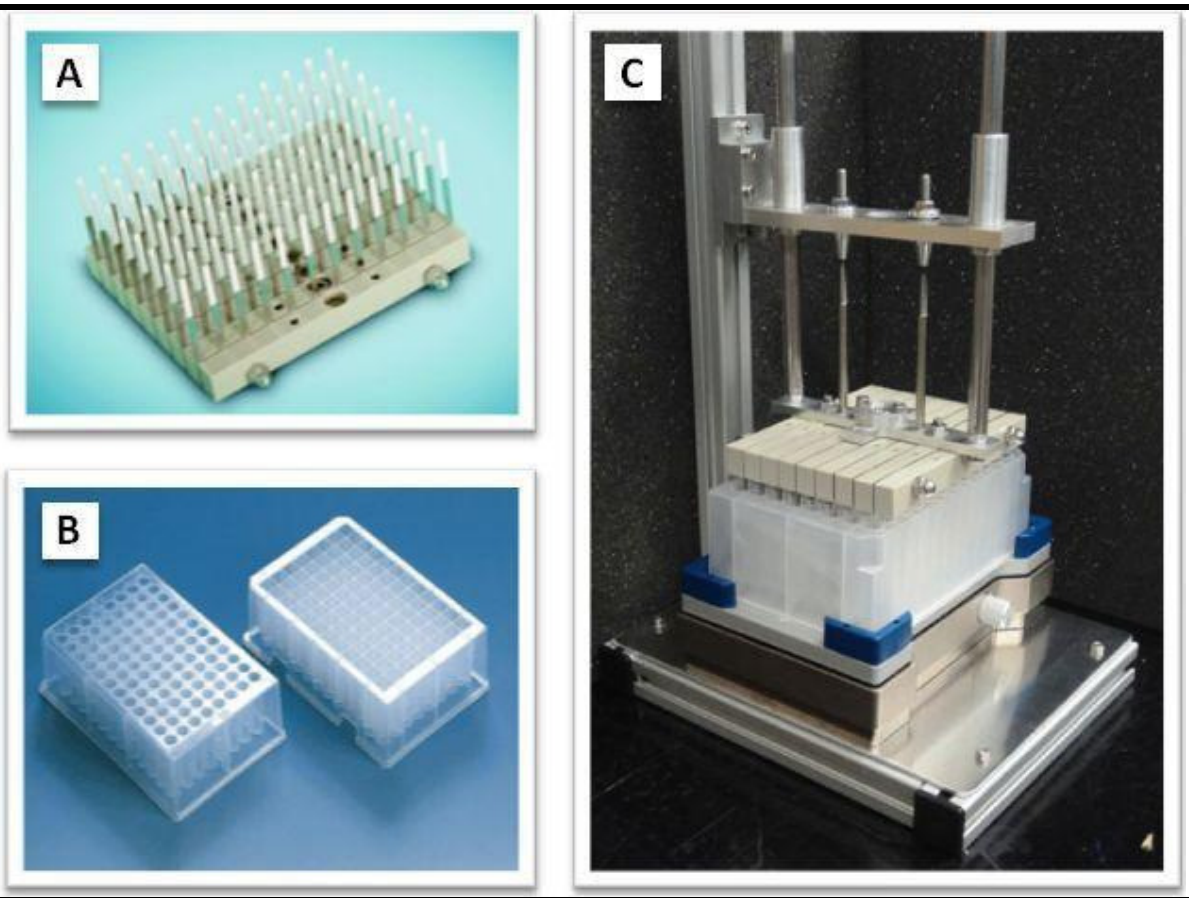

Figura 1.5 - Equipamentos utilizados para extração por SPME de 96 amostras simultaneamente. A) *Blades* (adaptado de Mirnaghi et al., 2011); B) 96-*well plate* (COLEPARMER, 2011); C) Estação do *SPME Multi-sampler*.

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).

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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO GERAL

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.

Capitulo 2 - Análise enantiosseletiva da isradipina e do seu principal metabólito em meio microssomal empregando HF-LPME-HPLC.

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.

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.

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/Guidance ComplianceRegulatoryInformation/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.

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 ComplianceRegulatoryInformation/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.