UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise enantiosseletiva de venlafaxina e de seus principais
metabólitos - aplicações em estudos de biotransformação *in vitro* e
*in vivo***

Tese de doutorado, apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção de
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Orientada: Patrícia da Fonseca
Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

Ribeirão Preto
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA 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.

da Fonseca, Patrícia

Análise enantiosseletiva de venlafaxina e de seus principais metabólitos - aplicações em estudos de biotransformação *in vitro* e *in vivo*. Ribeirão Preto, 2011. 96 p.: il.; 30 cm.

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

Orientadora: Bonato, Pierina Sueli.

1. Venlafaxina.
2. Análise enantiosseletiva.
3. Microextração em fase líquida.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Patrícia da Fonseca

Análise enantiosseletiva de venlafaxina e de seus principais metabólitos - aplicações em estudos de biotransformação *in vitro* e *in vivo*.

Tese de doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, José e Leonor, incansáveis incentivadores;

*Ao meu amado, Renato, pela confiança, compreensão e companheirismo.
Você foi fundamental para esta conquista;*

Ao meu pequenino, Vitor, filho tão desejado!

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abençoar com tantas oportunidades;

À orientadora e amiga Dra. Pierina, pelo enriquecimento científico, profissional e pessoal proporcionado neste período;

Aos amigos do Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar (CROEC) pela companhia e por todas as experiências trocadas;

Aos funcionários do departamento de Física e Química: Valquíria, Rosana, Perpétua e Roberto pelo auxílio técnico e disposição em ajudar;

Às funcionárias da seção de Pós-Graduação da FCFRP: Ana, Rosana e Rose pela atenção em todos os momentos;

Aos amigos da Zelus pelo apoio e compreensão;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e ao Departamento de Física e Química pela possibilidade de realização deste trabalho;

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

RESUMO

DA-FONSECA, P. **Análise enantiosseletiva de venlafaxina e de seus principais metabólitos - aplicações em estudos de biotransformação *in vitro* e *in vivo*.** 2011. 96f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A microextração em fase líquida com membranas cilíndricas ocas (HF-LPME) é uma técnica bastante interessante de preparação de amostras, uma vez que com pequenas quantidades de solventes orgânicos é possível a extração dos analitos presentes em matrizes complexas. Sendo assim, essa técnica foi empregada para extração da venlafaxina (VEN) e seus metabólitos em fração microssomal de fígado de ratos e plasma, visando o desenvolvimento de métodos para análise enantiosseletiva desses analitos. Esses métodos foram então empregados em um estudo *in vitro* de biotransformação da VEN e em um estudo piloto de disposição cinética em ratos e humanos. A VEN é um fármaco quiral empregado no tratamento da depressão, cujas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas são estereosseletivas. Após a otimização das condições de extração por HF-LPME, foram obtidas recuperações de 12-60%. O método empregado no estudo *in vitro* de biotransformação da VEN foi desenvolvido usando a coluna Chiralpak AD[®], fase móvel composta por hexano : 2-propanol (95:5, v/v) + 0,025% de dietilamina (DEA) e detecção por absorção no UV. A coluna Chiralpak AD-H[®] e a fase móvel composta por metanol : etanol (70:30, v/v) + 0,025% de DEA foram empregadas para análise da VEN e seus metabólitos em plasma. Para esse método, empregou-se a detecção por espectrometria de massas visando à obtenção de menores limites de quantificação. O método empregado para a determinação da VEN e de seus metabólitos em fração microssomal de fígado de ratos foi linear no intervalo de 200 a 5000 ng mL⁻¹ e o método empregado para a determinação da VEN e de seus metabólitos em amostras de plasma foi linear no intervalo de 5 a 500 ng mL⁻¹. Os métodos analíticos desenvolvidos para determinação da VEN e seus metabólitos nas matrizes biológicas foram aplicados em estudos de biotransformação *in vitro* e em estudos de disposição cinética em duas espécies (ratos e humanos). O objetivo destes estudos foi avaliar a correlação da biotransformação entre as diferentes espécies avaliadas e comparar os resultados obtidos nos estudos *in vitro* com os verificados nos estudos *in vivo*. Os resultados dos estudos empregando fração microssomal de fígado de ratos são semelhantes aos obtidos no estudo de disposição cinética em ratos, com formação mais pronunciada da *N*-desmetilvenlafaxina (N-VEN) e com produção prioritária do enantiômero (-)-(R). Comparando-se os estudos de disposição cinética em ratos e humanos, observa-se enantiosseletividade na biotransformação da VEN com a (-)-(R)-VEN sendo preferencialmente biotransformada. Entretanto, em humanos observa-se que a (-)-(R)-*O*-desmetilvenlafaxina ((-)-(R)-*O*-VEN) é formada em maior proporção enquanto que, em ratos, a (-)-(R)-*N*-VEN é preferencialmente formada.

Palavras-chave: venlafaxina, análise enantiosseletiva, microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca.

ABSTRACT

DA-FONSECA, P. **Enantioselective analysis of venlafaxine and its major metabolites – application to *in vitro* and *in vivo* biotransformation studies.** 2011. 96f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Hollow Fiber-Liquid Phase Microextraction (HF-LPME) is a very interesting technique for sample preparation, since it uses small amounts of organic solvents to extract drugs present in complex matrices. Thus, this technique was employed for the extraction of venlafaxine (VEN) and its metabolites from rat liver microsomal fraction and plasma, aiming the development of methods for the enantioselective analysis of these analytes. These methods were then applied to study the *in vitro* biotransformation and the kinetic disposition of VEN in rats and humans. VEN is a chiral drug used in the treatment of depression, whose pharmacokinetic and pharmacodynamic properties are stereoselective. After the optimization of the HF-LPME conditions, recoveries of 12-60% were obtained. The method employed in the *in vitro* biotransformation study of VEN was developed using a Chiralpak AD[®] column, mobile phase consisting of hexane : 2-propanol (95:5, v/v) + 0.025% of diethylamine (DEA) and UV detection. The Chiralpak AD-H[®] column and the mobile phase consisting of methanol : ethanol (70:30, v/v) + 0.025% of DEA were employed for the analysis of VEN and its metabolites in plasma. In order to obtain lower quantification limits, mass spectrometry detection was used in this method. The method used for the determination of VEN and its metabolites in rat liver microsomal fraction was linear over the concentration range of 200 to 5000 ng mL⁻¹ whereas the method used for the determination of VEN and its metabolites in plasma was linear in the range of 5 to 500 ng mL⁻¹. The developed methods for the determination of VEN in biological matrices were applied to an *in vitro* biotransformation study and to kinetic disposition studies in two species (rats and humans). The objective of these studies was to evaluate the correlation of the biotransformation between different species and to compare the results of the *in vitro* and *in vivo* studies. The results obtained using rat liver microsomal fraction were similar to those obtained in the rat kinetic disposition study, with more pronounced formation of *N*-desmethylvenlafaxine (N-VEN) and major production of the (-)-(R) enantiomer. Comparing the kinetic disposition studies in rats and humans, the enantioselectivity in the biotransformation of VEN with (-)-(R)-VEN being preferentially biotransformed was observed for both species. However, (-)-(R)-*O*-desmethylvenlafaxine ((-)-(R)-O-VEN) is preferentially formed in humans whereas the major metabolite in rat plasma is (-)-(R)-N-VEN.

Keywords: venlafaxine, enantioselective analysis, hollow fiber-liquid phase microextraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação da HF-LPME	9
Figura 2.	Estruturas da venlafaxina e de seus metabólitos O-desmetilvenlafaxina, N-desmetilvenlafaxina e NO-didesmetilvenlafaxina	12
Figura 3.	Procedimento de isolamento da fração microssomal a partir do homogeneizado de fígado	28
Figura 4.	Cromatograma da VEN, O-VEN, N-VEN, e NO-VEN na coluna Chirobiotic TAG®. Condições cromatográficas: fase móvel constituída por metanol:acetonitrila (50:50, v/v) + 0,1% de DEA na vazão de 0,5 mL min ⁻¹ . Detecção em 230 nm	36
Figura 5.	Cromatograma da VEN, O-VEN, N-VEN, e NO-VEN na coluna Chirobiotic V®. Condições cromatográficas: fase móvel constituída por etanol:metanol (70:30, v/v) + 0,025% de DEA + 0,2% de ácido acético na vazão de 0,4 mL min ⁻¹ . Detecção em 230 nm	37
Figura 6.	Cromatogramas da VEN, O-VEN, N-VEN, e NO-VEN na coluna Chiralcel OG®. Condições cromatográficas: fase móvel constituída por hexano:etanol:2-propanol (95:3:2, v/v/v) + 0,1% de DEA + 0,1% de ácido acético, vazão de 0,8 mL min ⁻¹ . Detecção em 230 nm	39
Figura 7.	Cromatogramas da VEN e O-VEN (A) e N-VEN e NO-VEN (B) na coluna ChiralpaK AD-H®. Condições cromatográficas: fase móvel constituída por metanol:etanol (70:30, v/v) + 0,025% de DEA na vazão de 0,5 mL min ⁻¹ . Detecção em 230 nm	40
Figura 8.	Cromatograma da VEN, O-VEN e N-VEN na coluna ChiralpaK AD®, Condições cromatográficas: fase móvel constituída por hexano:2-propanol (95:5, v/v) + 0,025% de DEA, na vazão de 1,0 mL min ⁻¹ . Detecção em 230 nm	41
Figura 9.	Avaliação de diferentes solventes orgânicos na extração da VEN e seus metabólitos por HF-LPME empregando ácido acético 0,1 mol L ⁻¹ (A) e ácido trifluoracético 0,1 mol L ⁻¹ (B) como fasesceptoras	46
Figura 10.	Plotagem do Minitab dos valores das áreas da VEN (A), O-VEN (B) e N-VEN (C) nos experimentos do planejamento fatorial fracionado com microssomas de ratos	49
Figura 11.	Avaliação do efeito da concentração de ácido na fase acceptora e da agitação do sistema na extração da VEN e seus metabólitos por HF-LPME. Experimento 1: ácido acético 0,1 mol L ⁻¹ e 1750 rpm; experimento 2: ácido acético 0,1 mol L ⁻¹ e 1000 rpm; experimento 3: ácido acético 0,5 mol L ⁻¹ e 1750 rpm; experimento 4: ácido acético 0,5 mol L ⁻¹ e 1000 rpm	50
Figura 12.	Cromatogramas das amostras submetidas à extração. A corresponde ao branco do meio de incubação e B meio de incubação contendo VEN, N-VEN e O-VEN. Os picos 1 e 2 correspondem a (-)-(R)-VEN e (+)-(S)-VEN, os picos 3 e 4 a (-)-(R)-N-VEN e (+)-(S)-N-VEN e os picos 5 e 6 a (-)-(R)-O-VEN e (+)-(S)-O-VEN. Condições cromatográficas: coluna ChiralpaK AD®, fase móvel constituída por hexano: 2-propanol (95:5, v/v) + 0,025% de DEA na vazão de 1,0 mL min ⁻¹ , detecção em 230 nm	51
Figura 13.	Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da N-VEN (intervalo de concentração de 200 a 5000 ng mL ⁻¹ para cada enantiômero)	53

Figura 14.	Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da O-VEN (intervalo de concentração de 200 a 5000 ng mL ⁻¹ para cada enantiômero)	53
Figura 15.	Cromatograma das amostras submetidas à extração após incubação. Os picos 1 e 2 correspondem a (-)-(R)-VEN e (+)-(S)-VEN, os picos 3 e 4 a (-)-(R)-N-VEN e (+)-(S)-N-VEN e os picos 5 e 6 a (-)-(R)-O-VEN e (+)-(S)-O-VEN. Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD [®] , fase móvel constituída por hexano: 2-propanol (95:5, v/v) + 0,025% de DEA, na vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e detecção em 230 nm. Condição de incubação: Concentração de proteínas no meio de incubação: 4,0 mg mL ⁻¹ , tempo: 30 min	60
Figura 16.	Variação da concentração dos enantiômeros da N-VEN em função da concentração de proteínas no meio de incubação	61
Figura 17.	Variação da concentração dos enantiômeros da O-VEN em função da concentração de proteínas no meio de incubação	61
Figura 18.	Variação da concentração dos enantiômeros da N-VEN em função do tempo de incubação; A : 0 – 60 min, B : 0 – 30 min	62
Figura 19.	Variação da concentração dos enantiômeros da O-VEN em função do tempo de incubação	63
Figura 20.	Variação da concentração dos enantiômeros da N-VEN e O-VEN em função da variação da concentração do substrato (VEN)	64
Figura 21.	Espectros de massas resultantes da fragmentação após infusão direta dos padrões de Atenolol (A), NO-VEN (B), N-VEN (C), O-VEN (D) e VEN (E)	66
Figura 22.	Plotagem do Minitab dos valores das áreas da VEN (A), O-VEN (B) e N-VEN (C) nos experimentos do planejamento fatorial fracionado com as amostras de plasma	67
Figura 23.	Cromatogramas de plasma fortificado com os enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN e submetido à extração. A : os picos 1 e 2 correspondem a (+)-(S)-VEN e (-)-(R)-VEN. B atenolol. C : os picos 1 e 2 correspondem a (+)-(S)-N-VEN e (-)-(R)-N-VEN. D : os picos 1 e 2 correspondem a (+)-(S)-O-VEN e (-)-(R)-O-VEN. Condições cromatográficas: coluna Chiralpak AD-H [®] , fase móvel constituída por metanol: etanol (70:30, v/v) + 0,025% de DEA na vazão de 0,5 mL min ⁻¹	69
Figura 24.	Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da VEN (intervalo de concentração de 5 a 500 ng mL ⁻¹ para cada enantiômero)	70
Figura 25.	Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da N-VEN (intervalo de concentração de 5 a 500 ng mL ⁻¹ para cada enantiômero)	71
Figura 26.	Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da O-VEN (intervalo de concentração de 5 a 500 ng mL ⁻¹ para cada enantiômero)	71
Figura 27.	Gráfico da concentração plasmática (média ± SD) <i>versus</i> tempo de coleta referente à análise das amostras de plasma de ratos após dose oral única da Venlafaxina racêmica (n=3)	77

Figura 28. Gráfico da concentração plasmática (média $\pm$ SD) *versus* tempo de coleta referente à análise das amostras de plasma humano após dose oral única da Venlafaxina racêmica (n=3) 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Diferenças farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas dos enantiômeros de alguns fármacos quirais	3
Tabela 2.	Parâmetros controlados na HF-LPME para otimização do método	10
Tabela 3.	Resumo dos métodos quirais disponíveis para a determinação da VEN e seus metabólitos em matrizes biológicas	14
Tabela 4.	Experimentos realizados para avaliar a influência de diferentes solventes orgânicos e fases aceptoras na extração da VEN e seus metabólitos por HF-LPME	20
Tabela 5.	Fatores estudados no planejamento fatorial fracionado	20
Tabela 6.	Testes realizados no planejamento fatorial fracionado	21
Tabela 7.	Testes realizados para avaliar a interação entre os fatores força da fase aceptora e agitação do sistema na extração da VEN e de seus metabólitos	21
Tabela 8.	Procedimento para dosagem de proteínas	27
Tabela 9.	Íons precursores e respectivos produtos monitorados em MRM	30
Tabela 10.	Fatores estudados no planejamento fatorial fracionado do procedimento de extração da VEN e seus metabólitos de plasma empregando HF-LPME	32
Tabela 11.	Testes realizados no planejamento fatorial fracionado do procedimento de extração da VEN e seus metabólitos de plasma empregando HF-LPME	32
Tabela 12.	Concentrações avaliadas na validação do método de análise dos enantiômeros da VEN, O-VEN e N-VEN em plasma	33
Tabela 13.	Comparação dos resultados obtidos com as colunas quirais baseadas em antibióticos macrocíclicos	43
Tabela 14.	Comparação dos resultados obtidos com as colunas quirais baseadas em derivados de polissacarídeos	43
Tabela 15.	Porcentagem de recuperação dos enantiômeros da N-VEN e O-VEN em função das diferentes concentrações no meio de incubação	54
Tabela 16.	Precisão e exatidão intra e interensaios do método de análise dos enantiômeros da N-VEN	55
Tabela 17.	Precisão e exatidão intra e interensaios do método de análise dos enantiômeros da O-VEN	56
Tabela 18.	Precisão e exatidão referentes à avaliação dos limites de quantificação dos enantiômeros da N-VEN e O-VEN	56
Tabela 19.	Estudo da estabilidade dos metabólitos da VEN no tempo de análise, ciclos de congelamento-descongelamento e condição de incubação	57
Tabela 20.	Valores de resolução (R_s) e fator de separação (α) na avaliação da robustez do método	58

Tabela 21.	Porcentagem de recuperação dos enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN em função das diferentes concentrações no plasma	72
Tabela 22.	Precisão e exatidão intra e interensaios para análise dos enantiômeros da VEN	73
Tabela 23.	Precisão e exatidão intra e interensaios para análise dos enantiômeros da N-VEN	74
Tabela 24.	Precisão e exatidão intra e interensaios para análise dos enantiômeros da O-VEN	74
Tabela 25.	Precisão e exatidão referentes à avaliação dos limites de quantificação para os enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN	75
Tabela 26.	Estudos de estabilidade no tempo de análise e ciclos de congelamento-descongelamento	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	fator de separação
AA	ácido acético
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	ionização a pressão atmosférica
CE	eletroforese capilar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMD	concentração média determinada
CN	grupo ciano
CSP	fase estacionária quiral
CV	coeficiente de variação
CYP	citocromo P450
DEA	dietilamina
DP	estimativa do desvio padrão
DPR	estimativa do desvio padrão relativo
<i>E</i>	erro relativo
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	eletronebulização
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	cromatografia gasosa
HF-LPME	microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
LC	cromatografia líquida
LLE	extração líquido-líquido
NADP	β -Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato
N-VEN	N-desmetilvenlafaxina
NO-VEN	NO-didesmetilvenlafaxina
NRS	<i>NADPH regenerating system</i>
MRM	monitoramento de reações múltiplas
MS	espectrometria de massas
<i>m/z</i>	razão massa/ carga

O-VEN	O-desmetilvenlafaxina
pKa	- log da constante de ionização de um ácido
r^2	coeficiente de determinação
R_s	resolução
SPE	extração em fase sólida
TEA	triethylamina
TFA	ácido trifluoracético
t_R	tempo de retenção
UI	unidades internacionais
UV	ultravioleta
V	vazão
VEN	venlafaxina
v/v	volume/ volume

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas e Siglas	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Fármacos quirais	1
1.2 Análise enantiosseletiva por cromatografia líquida de alta eficiência	3
1.2.1 Fases estacionárias quirais	3
1.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Espectrometria de massas	6
1.3 Preparação de amostras de origem biológica	7
1.4 Venlafaxina	10
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Otimização da resolução dos enantiômeros da VEN e seus metabólitos	16
3.1.1. Sistema cromatográfico	16
3.1.2 Reagentes e solventes	16
3.1.3 Soluções-padrão	16
3.1.4 Colunas quirais	17
3.2 Análise enantiosseletiva de venlafaxina e seus metabólitos em microssomas de fígado de ratos empregando HF-LPME/LC-UVis	18
3.2.1 Análise cromatográfica	18
3.2.2 Soluções-padrão	18
3.2.3. Preparação das amostras	18
3.2.3.1 Equipamentos	18
3.2.3.2. Reagentes e solventes	18
3.2.4 Validação do método	22
3.2.4.1 Curva analítica e linearidade	22
3.2.4.2 Recuperação	22
3.2.4.3 Precisão e exatidão	23
3.2.4.4 Limite de quantificação	24
3.2.4.5 Estabilidade	24
3.2.4.6 Robustez	25
3.2.5. Aplicação do método HF-LPME/LC-UVis em um estudo de biotransformação empregando microssomas de fígado de ratos	25
3.2.5.1 Equipamentos	25
3.2.5.2 Reagentes e solventes	26
3.2.5.3 Animais	26

3.2.5.4 Isolamento da fração microssomal do fígado de ratos	26
3.2.5.5 Dosagem de proteínas	27
3.2.5.6 Procedimento de incubação	28
3.3 Análise enantiosseletiva de venlafaxina e seus metabólitos em plasma empregando HF-LPME/LC-MS-MS	29
3.3.1 Análise cromatográfica	29
3.3.1.1 Sistema cromatográfico	29
3.3.1.2 Reagentes e solventes	30
3.3.1.3 Coluna quiral e coluna de guarda	30
3.3.1.4 Soluções-padrão	31
3.3.2 Preparação das amostras	31
3.3.2.1 Equipamentos, reagentes e solventes	31
3.3.2.2 Amostras de plasma	31
3.3.2.3 Otimização das condições de extração por HF-LPME para a determinação da VEN e seus metabólitos em amostras de plasma	31
3.3.3 Validação do método	32
3.3.4 Aplicação do método de LPME/LC-MS-MS em estudos de disposição cinética	33
3.3.4.1 Disposição cinética em ratos	33
3.3.4.2 Disposição cinética em humanos	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Otimização da separação dos enantiômeros	35
4.1.1 Colunas baseadas em antibióticos macrocíclicos	35
4.1.1.1 Coluna Chirobiotic T [®] e coluna Chirobiotic TAG [®]	35
4.1.1.2 Coluna Chirobiotic V [®]	36
4.1.2 Colunas baseadas em derivados de polissacarídeos	37
4.1.2.1 Coluna Chiralcel OG [®]	38
4.1.2.2 Coluna Chiralpak AD-H [®]	39
4.1.2.3 Coluna Chiralpak AD [®]	40
4.1.2.4 Outras colunas avaliadas	41
4.1.3 Comparação das colunas quirais	42
4.1.4 Ordem de eluição dos enantiômeros VEN e seus metabólitos (N-VEN e O-VEN)	44
4.2 Análise enantiosseletiva de venlafaxina e seus metabólitos em microssomas de fígado de ratos empregando HF-LPME/LC-UVis	45
4.2.1 Otimização das condições de extração por HF-LPME para determinação da VEN e seus metabólitos no meio de incubação	45
4.2.2 Validação	50
4.2.2.1 Seletividade	52
4.2.2.2 Linearidade	52
4.2.2.3 Recuperação	53
4.2.2.4 Precisão e exatidão	54

4.2.2.5 Limite de quantificação	56
4.2.2.6 Estabilidade	57
4.2.2.7 Robustez	57
4.2.3. Aplicação do método HF-LPME/LC-UVis em um estudo de biotransformação empregando microssomas de fígado de ratos	58
4.2.3.1. Otimização das condições de incubação	60
4.2.3.1.1 Concentração de proteínas da fração microssomal no meio de incubação	60
4.2.3.1.2 Tempo de incubação	62
4.2.3.1.3. Concentração do substrato	63
4.3 Análise enantiosseletiva de venlafaxina e seus metabólitos em plasma empregando HF-LPME/LC-MS-MS	65
4.3.1 Análise cromatográfica	65
4.3.2 Otimização das condições de extração por HF-LPME para a determinação da VEN e seus metabólitos em amostras de plasma	66
4.3.3 Validação	69
4.3.3.1 Linearidade	70
4.3.3.2 Recuperação	71
4.3.3.3 Precisão e exatidão	73
4.3.3.4 Limite de quantificação	75
4.3.3.5 Estabilidade	75
4.3.4 Aplicação do método de LPME/LC-MS-MS em estudos de disposição cinética da VEN	76
4.4 Comparação entre o estudo de biotransformação <i>in vitro</i> e os estudos de disposição cinética da VEN em ratos e humanos	78
5 . CONCLUSÕES	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	95

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Fármacos quirais

A ação de fármacos é o resultado de processos farmacodinâmicos e farmacocinéticos, pelos quais eles entram, interagem e deixam o organismo. As interações biológicas que acontecem nesses processos são bastante seletivas. Se o fármaco em questão for um composto quiral e administrado como racemato, as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas podem diferir de um enantiômero para outro (TUCKER; LENNARD, 1990; BROCKS, 2006), pois os enantiômeros apresentam propriedades químicas e físicas idênticas, mas eles demonstram comportamentos distintos em ambientes quirais. Esta característica é de extrema importância biológica uma vez que a maioria dos receptores endógenos de fármacos, como proteínas de membrana e enzimas, também são compostos quirais (TESTA, 1986; SRINIVAS, 2006).

Em relação às características farmacodinâmicas, é comum haver diferenças de afinidade entre os enantiômeros em suas ligações aos receptores, o que leva a diferentes potências entre estes compostos (RENTSCH, 2002; TRIGGLE, 1997). Assim, o isômero (S)- do verapamil é detentor da maior parte do efeito antiarrítmico observado para este fármaco (GROSS; HEUER; EICHELBAUM, 1988). Em casos mais extremos, um dos enantiômeros é quase inativo, como é o caso do (S)- losartan, praticamente desprovido de efeito inibidor da enzima conversora de angiotensina (NOEL et al., 2004).

Em relação à farmacocinética, a afinidade dos enantiômeros com as proteínas transportadoras pode ocasionar diferenças na absorção; o mesmo efeito pode ser observado na distribuição dos enantiômeros (MCCONATHY; OWENS, 2003). Na biotransformação, devido à estereosseletividade das enzimas, a velocidade de metabolização é geralmente diferente para cada isômero (CAMPO; BERNARDES; CARVALHO, 2009; BARREIRO et al., 1997; TUCKER; LENNARD, 1990). Existem vários outros exemplos de fármacos que apresentam diferenças farmacológicas como consequência de processos farmacodinâmicos e farmacocinéticos enantiosseletivos e alguns deles são mostrados na Tabela 1 (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001).

Em função das características de disposição cinética e dinâmica estereosseletivas, a questão da quiralidade passou a ser considerada no planejamento e síntese de novos produtos farmacêuticos; por outro lado, os fármacos já comercializados como racematos têm sido estudados para verificar se existem vantagens na produção como enantiômeros puros (BONATO, 2010; AGRANAT; WAINSCHEIN, 2010; BONATO; JABOR; GAITANI, 2005).

Vários países possuem legislações próprias quanto ao desenvolvimento e comercialização de fármacos quirais. Nota-se entre elas que muitos pontos são convergentes em relação à importância do assunto e as normas exigidas (NOEL et al., 2004). O FDA (*Food and Drug Administration*) e órgãos equivalentes no Japão, Canadá e Comunidade Européia enfatizam a necessidade de se ter informações sobre propriedades físico-químicas, cinéticas e dinâmicas estereosseletivas de fármacos quirais e recomendam a produção de novos fármacos na forma de enantiômeros puros (SANTORO et al., 2001).

No Brasil, a legislação é bastante vaga sobre o assunto, deixando entender que não há necessidade de determinação enantiosseletiva do fármaco no plasma, sendo somente exigidos, em certos casos, os teores de cada um dos enantiômeros na etapa de avaliação da equivalência farmacêutica (NOEL et al., 2004).

Independente dos aspectos legais existe o interesse da comunidade científica e de empresas farmacêuticas em saber como os enantiômeros de fármacos quirais se comportam no organismo. Para se avaliar os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros após administração de fármacos quirais é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos enantiosseletivos que permitam a quantificação dos isômeros em materiais biológicos. No desenvolvimento desses métodos é necessário considerar não apenas a capacidade das técnicas analíticas empregadas na resolução dos enantiômeros, mas também a eficiência de procedimentos adequados de preparação das amostras (SMITH, 2003).

Tabela 1. Diferenças farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas dos enantiômeros de alguns fármacos quirais.

Fármaco quiral	Diferenças farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas dos enantiômeros
Praziquantel	A atividade anti-helmíntica é associada principalmente ao (-)-(R)-enantiômero, que também é preferencialmente biotransformado (ANDREWS, 1985).
Oxibutinina	A velocidade de biotransformação da (S)-oxibutinina é maior do que a da (R)-oxibutinina; o metabólito (R)-desetiloxibutinina se liga mais extensivamente a proteínas plasmáticas (MIZUSHIMA et al., 2007).
Varfarina	A potência da (-)-(S)-varfarina é 2 a 5 vezes maior que da (+)-(R)-varfarina (HYNECK; DENT; HOOK, 1990).
Omeprazol	O (+)-(R)-omeprazol é biotransformado principalmente pelo CYP2C19 enquanto que a CYP3A4 é responsável pela biotransformação do (-)-(S)-omeprazol (CEDEBERG; ANDERSSON; SKANBERG, 1989).
Salbutamol	O enantiômero -(R) é o responsável pelo efeito broncodilatador do fármaco (SHAH et al., 1999).
Ibuprofeno	A atividade antiinflamatória é atribuída principalmente à isoforma -(S) (AVGERINOS; NOORMOHAMMADI; HUTT, 1991).

1.2 Análise enantiosseletiva por cromatografia líquida de alta eficiência

1.2.1 Fases estacionárias quirais

O emprego de técnicas analíticas para a resolução e quantificação de fármacos quirais em matrizes biológicas é essencial para se compreender os aspectos farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos destes compostos. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica simples, robusta e muito versátil e, é a mais empregada para análise de fármacos quirais (ZHANG et al., 2005).

Inicialmente, a separação de compostos quirais por HPLC era realizada a partir de métodos indiretos. Nestes métodos, a formação dos diastereoisômeros ocorre a partir da reação do composto de interesse com um reagente de derivação quiral e enantiomericamente puro (HAGINAKA, 2002; CASS et al., 1997). Atualmente, a grande maioria das separações quirais é feita empregando o método direto. No método direto, a separação dos enantiômeros ocorre devido ao emprego de aditivos quirais na fase móvel ou, mais freqüentemente, pelo emprego de fases estacionárias quirais (CSPs – *Chiral Stationary Phases*). A separação empregando CSPs é a técnica mais usada na resolução de compostos quirais por HPLC (THOMPSON, 2005).

Nas últimas décadas houve um aumento significativo no número de CSPs disponíveis comercialmente permitindo a resolução de um número expressivo de racematos. Uma grande variedade de seletores quirais tem sido utilizada no preparo das CSPs, dentre eles: polissacarídeos, proteínas, antibióticos macrocíclicos, ciclodextrinas e outros (LOURENÇO; CASSIANO; CASS, 2010; DE SANTANA et al., 2009; ABOUL-ENEIN; ALI, 2002). Estes seletores quirais são incorporados ou imobilizados na superfície de um suporte (usualmente a sílica gel) e interagem de maneira seletiva com os enantiômeros (BONATO et al., 2002).

As CSPs baseadas em polissacarídeos são as mais populares e são formadas, principalmente, por derivados de amilose e celulose. Estas CSPs exibem elevada estabilidade e grande capacidade de discriminação quiral e resolução de uma ampla variedade de compostos. O mecanismo de discriminação quiral das CSPs baseadas em polissacarídeos tem sido exaustivamente investigado e os estudos sugerem que os derivados de celulose e amilose apresentam uma estrutura de “calha” helicoidal com os grupos carbamatos e benzoatos localizados no seu interior e os grupos hidrofóbicos localizados externamente (LÄMMERHOFER, 2010). Os principais tipos de interações que ocorrem entre os solutos e a fase estacionária são interações polares, como ligações de hidrogênio, interações π - π e interações dipolo-dipolo (YASHIMA; OKAMOTO, 1995).

A maioria dos métodos descritos na literatura empregando CSPs baseadas em derivados de polissacarídeos faz uso do modo de eluição normal, ou seja, com fases móveis constituídas por hexano e um álcool. Para análise de compostos básicos e ácidos, essas fases móveis são adicionadas de dietilamina ou ácido trifluoracético, respectivamente. Entretanto, estas fases estacionárias também

permitem o emprego dos modos de eluição reverso e polar orgânico (MATTHIJS; MAFTOUH; HEYDEN, 2006; OKAMOTO; YASHIMA, 1998). No modo reverso, as fases móveis são constituídas por misturas de água e um solvente orgânico polar como acetonitrila ou metanol. Essa mistura pode ser acidificada ou adicionada de aditivos como perclorato de sódio, quando se faz a análise de compostos ácidos e básicos, respectivamente. O emprego do modo polar orgânico, caracterizado pelo uso de solventes polares ou suas misturas, tem se destacado devido às vantagens como solubilidade de um grande número de compostos, compatibilidade com a detecção por espectrometria de massas e facilidade de emprego em escala preparativa (MATTHIJS; MAFTOUH; HEYDEN, 2006; ZHANG et al., 2005). Embora os fabricantes destas colunas recomendem colunas específicas para cada modo de eluição, existem trabalhos que demonstram não haver perda de desempenho quando se trabalha com eluição multimodal, aumentando ainda mais a aplicabilidade destas colunas para separações quirais (OKAMOTO; KAIDA, 1994).

A mais recente inovação das CSPs baseadas em polissacarídeos está relacionada com o uso dos derivados de polissacarídeos imobilizados em um suporte cromatográfico, geralmente sílica; até então, estes derivados de polissacarídeos eram empregados recobrimdo o suporte de sílica, sem que houvesse ligações químicas entre o material de recobrimento e o suporte (IKAI et al., 2008; MITCHELL; BENZ; ZHANG, 2008). A partir de 2004, três colunas de polissacarídeos imobilizados são comercializadas: CHIRALPAK IA, CHIRALPAK IB e CHIRALPAK IC, as quais são constituídas por tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e tris-(3,5-diclorofenilcarbamato) de celulose, respectivamente (FRANCO; ZHANG, 2008). A imobilização de derivados de polissacarídeos permite o emprego de uma variedade praticamente ilimitada de solventes orgânicos e esta versatilidade aumenta a capacidade de resolução quiral, tanto em escala analítica como preparativa (LÄMMERHOFER, 2010; ZHANG; NGUYEN; FRANCO, 2008; THUNBERG; HASHEME; ANDERSSON, 2008).

Vários antibióticos macrocíclicos têm sido usados como seletores quirais, já que as diversas funcionalidades presentes nas suas estruturas permitem várias interações entre o analito e a fase estacionária, dentre elas: interações eletrostáticas, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações π - π (LLISZ; BERKECZ; PÉTER, 2009; ABOUL-ENEIN; ALI, 2002).

Os antibióticos macrocíclicos empregados para separações quirais em HPLC incluem ansamicinas (rifamicina), os glicopeptídeos (avoparcina, teicoplanina, ristocetina A, vancomicina e seus análogos) e o antibiótico polipeptídico tiostreptona. As colunas Chirobiotic[®] apresentam como seletores quirais os antibióticos macrocíclicos ligados covalentemente a um suporte de sílica. As colunas Chirobiotic V[®] (vancomicina), Chirobiotic T[®] (teicoplanina) Chirobiotic TAG[®] (teicoplanina aglicona) e Chirobiotic R[®] (ristocetina A) são as mais utilizadas (LLISZ; BERKECZ; PÉTER, 2009). As colunas com estas CSPs exibem boa estabilidade mecânica, apresentam preços compatíveis e podem ser empregadas para fins preparativos (WARD; FARRIS, 2001). Essas colunas também podem ser usadas nos três modos de eluição.

Já as colunas baseadas em proteínas, preparadas com albumina bovina, α -1-glicoproteína ácida, proteína ovomucóide, glicoamilase entre outras, são usadas com fases móveis aquosas tamponadas, juntamente com solventes orgânicos, com o objetivo de reduzir a interação hidrofóbica (BONATO et al., 2002). Estas colunas, usualmente, não são robustas e apresentam baixa capacidade, não sendo empregadas em escala preparativa (HAGINAKA, 2008; HAGINAKA, 2002).

1.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Espectrometria de Massa

O acoplamento da HPLC com a espectrometria de massas (MS – *Mass Spectrometry*) agrega as vantagens que estas duas técnicas apresentam separadamente: alta eficiência, seletividade, detectabilidade e possibilidade de obtenção de informações adicionais relacionadas à estrutura dos analitos de interesse (AL-DIRBASHI; NAKASHIMA, 2000; VOGESER; SEGER, 2008). O interfaceamento HPLC-MS caracterizou-se pelas diversas tentativas em resolver as incompatibilidades fundamentais inerentes das duas técnicas. A primeira refere-se à quantidade do efluente da coluna que pode ser introduzida no sistema de vácuo do MS. A segunda incompatibilidade refere-se à composição do efluente da coluna, já que não é possível o emprego de fases móveis contendo aditivos não voláteis. Finalmente, os compostos analisados por HPLC são, usualmente, analitos polares, instáveis termicamente e muitas vezes de elevada massa molar, ou seja, compostos difíceis de serem ionizados (KOSTIAINEN; KAUPPILA, 2009).

Para contornar essas limitações, várias interfaces foram desenvolvidas. A interface é um dispositivo colocado entre o equipamento de cromatografia líquida e o MS e serve para remover o solvente e transferir a amostra para a fonte de íons (DE GRANDE; AQUINO NETO, 1990). Existem diversos tipos de interface, porém as baseadas em ionização à pressão atmosférica, que engloba a ionização química à pressão atmosférica (APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e a eletronebulização (ESI - *Electrospray Ionization*), são atualmente as mais empregadas (CROTTI et al., 2006). Essas interfaces ainda não são compatíveis com fases móveis não voláteis, mas se aplicam a todos os compostos que são analisados por HPLC; a interface ESI pode inclusive ser usada na análise de macromoléculas biológicas como proteínas (KOSTIAINEN; KAUPPILA, 2009).

A principal técnica de ionização a pressão atmosférica é a ESI. Nesta técnica, a amostra dissolvida na fase móvel volátil e acidificada ou alcalinizada, de forma a causar a ionização da molécula, é conduzida por um capilar metálico submetido a um alto potencial elétrico, resultando na formação de uma dupla camada elétrica na interface capilar/ solução. Consequentemente, formam-se gotas carregadas que, com a evaporação do solvente liberam micro-gotas que, posteriormente, liberam os íons que serão analisados no analisador de massas (BAKHTIAR; MAJUMDAR, 2007). A técnica ESI tem sido amplamente utilizada, tanto para quantificação como também para estudos de determinação estrutural (CROTTI et al., 2006).

Os íons obtidos nas diferentes interfaces do MS podem ser analisados empregando um ou mais analisadores de massas, sendo que os do tipo *ion trap*, *time of flight* (TOF) e quadrupolo são os mais empregados (ARDREY, 2003). O monitoramento dos íons pode ser realizado de diferentes maneiras. Para análise quantitativa, o monitoramento de íons selecionados (SIM) e o monitoramento de reações múltiplas (MRM) são os métodos mais utilizados (BAKHTIAR; MAJUMDAR, 2007). Nesse último caso, é necessário o emprego de equipamentos do tipo triplo quadrupolo.

1.3 Preparação de amostras de origem biológica

A análise de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas (soro, plasma, urina, etc.) requer procedimentos eficazes de preparação das amostras em função da elevada complexidade destas matrizes (alta concentração de proteínas e

compostos endógenos e baixa concentração do analito de interesse) (KATAOKA, 2003). Este pré-tratamento visa adequar a amostra ao sistema cromatográfico usado e, ainda tem como objetivos, remover os interferentes e concentrar o analito (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

Embora técnicas tradicionais de preparação de amostras (extração líquido-líquido (LLE - *Liquid-Liquid Extraction*) e extração em fase sólida (SPE - *Solid-Phase Extraction*) ainda sejam amplamente empregadas, as tendências apontam para a utilização de menores quantidades de amostras, maior seletividade e especificidade na extração, emprego de quantidade mínima de solventes orgânicos e aumento no potencial de automação (SMITH, 2003).

Na LLE, a miniaturização tem como objetivo reduzir a razão volumétrica entre a fase aquosa (doadora) e a fase orgânica (aceptora) e favorecer a transferência dos analitos da fase doadora para a fase aceptora (elevado fator de enriquecimento) (de OLIVEIRA et al., 2008).

Pedersen Bjergaard & Rasmussen introduziram o conceito de extração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas, denominada microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (HF - LPME - *Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction*). Nesta técnica, os poros de uma membrana capilar porosa e hidrofóbica são impregnados com o solvente orgânico de extração e o seu lúmen é preenchido com a fase aceptora (Figura 1) (BJERGAARD-PEDERSEN; RASMUSSEN, 2005). Dependendo da composição da fase aceptora, a HF-LPME pode ser classificada como sistema de duas fases, onde a solução aceptora corresponde ao mesmo solvente orgânico impregnado nos poros da membrana, e sistema de três fases, no qual a solução aceptora corresponde a uma solução aquosa com pH oposto ao pH da fase doadora (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

Figura 1. Representação da HF-LPME. Fonte: Saymon Moffa.

O tipo de sistema empregado na HF-LPME depende das características do analito de interesse; no caso de fármacos e metabólitos de caráter neutro ou de baixa polaridade, o sistema de duas fases é mais indicado; quando se tratar de analitos moderadamente hidrofóbicos com grupos ionizáveis (ácidos ou bases fracas), o sistema de três fases é a melhor opção (ANDERSEN et al., 2002). Para analitos altamente hidrofílicos, que encontram dificuldades de serem extraídos pelos solventes orgânicos, é possível a adição de um reagente iônico relativamente hidrofóbico na fase doadora ou orgânica, permitindo a formação de par iônico com o analito de interesse e possibilitando a extração (HO et al., 2003).

A cinética do processo de extração por HF-LPME depende de alguns parâmetros que devem ser otimizados durante o desenvolvimento do método (Tabela 2) (RASMUSSEN; BJERGAARD-PEDERSEN, 2004; RASMUSSEN et al., 2000; ANDERSEN et al., 2002).

Tabela 2. Parâmetros controlados na HF-LPME para otimização do método.

Parâmetro	Valores mais empregados
Tamanho da membrana	1,5 – 15 cm
Tamanho dos poros da membrana	0,2 µm
Diâmetro interno da membrana	600 µm
Volume de amostra	0,1 – 4,0 mL
pH da fase doadora	Meio ácido ou básico
pH da fase aceptora (sistema de três fases)	Meio ácido ou básico
Agitação da amostra	1000 – 2500 rpm
Tempo de extração	5 – 45 min
Solvente orgânico	Éter n-hexílico, 1-octanol, acetato de dodecila, etc

Depois de concluído o tempo de extração, a solução aceptora é retirada da membrana e pode ser diretamente analisada por HPLC, eletroforese capilar ou cromatografia gasosa (HO et al., 2003; PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003).

A HF-LPME tem sido amplamente empregada para a determinação de compostos em diferentes matrizes como fármacos e metabólitos em amostras biológicas (SIMÕES; DE OLIVEIRA; BONATO, 2011; CALIXTO; BONATO, 2010, KIM et al., 2009, DOS SANTOS; BONATO, 2008; DA FONSECA et al., 2008), contaminantes em amostras ambientais (WANG et al., 2010; TAO et al., 2009^a; TAO et al., 2009^b; HUANG; HUANG, 2007), toxinas em bebidas alcoólicas (ROMERO-GONZÁLEZ et al., 2010), etc.

1.4 Venlafaxina

A venlafaxina (VEN) (Figura 2) é um fármaco quiral empregado na forma de racemato para o tratamento da depressão. Este fármaco foi um dos pioneiros de uma nova classe de antidepressivos, denominada de antidepressivos atípicos. Esta nova classe, diferentemente dos antigos antidepressivos tricíclicos, apresenta efeitos adversos minimizados, devido à ação seletiva destes compostos nos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico (RUDAZ et al., 2000). O efeito terapêutico da VEN é atribuído à inibição da recaptação de aminas (serotonina, noradrenalina e, em menor proporção, dopamina) nos neurônios pré-sinápticos. Os efeitos adversos são inferiores quando comparados aos efeitos provocados por outros antidepressivos, já que este fármaco não exerce ação nos receptores muscarínicos, histamínicos ou α -adrenérgicos (VU et al., 1997; PRESKORN, 1997).

Os dois enantiômeros da VEN atuam de diferentes maneiras nos receptores; a isoforma (-)-(R) inibe a recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina; já a isoforma (+)-(S) inibe exclusivamente a recaptação de serotonina (FANALI et al., 2001; WEN; FENG; HUAN-DE, 2007).

A VEN é bem absorvida por via oral com biodisponibilidade de aproximadamente 45%. A concentração plasmática máxima é atingida em 2 horas após administração de uma dose de 75 mg e a meia vida é de 5 horas. A VEN sofre biotransformação hepática pronunciada formando prioritariamente a *O*-desmetilvenlafaxina (O-VEN) e dois metabólitos em menor proporção: *N*-desmetilvenlafaxina (N-VEN) e *N,O*-didesmetilvenlafaxina (NO-VEN) (Figura 2). Todos os metabólitos da VEN são compostos quirais, sendo que a O-VEN é o único que apresenta atividade farmacológica semelhante à VEN (RUDAZ et al., 2000). Em 2007, o FDA aprovou o succinato de desvenlafaxina que é o sal monohidratado da O-VEN. Este fármaco atua inibindo a recaptação de serotonina e noradrenalina e é empregado para o tratamento da depressão e no alívio de sintomas vasomotores associados com a menopausa (KAMATH; HANDRATTA, 2008).

Estudos *in vitro* demonstram que a *O*-desmetilação é mediada, principalmente, pelo CYP2D6 e a *N*-desmetilação pelo CYP3A4 (SÁNCHEZ; HYTTEL, 1997; AMCHIN et al., 1999).

Embora pouco descrita na literatura, a disposição cinética da VEN também parece ser enantiosseletiva, principalmente no que se refere a sua biotransformação. Um estudo de disposição cinética realizado em ratos demonstrou maiores concentrações plasmáticas da (+)-(S)-VEN após a administração de doses múltiplas de VEN (WANG et al., 1992). Eap et al. (2003) evidenciaram que a *O*-desmetilação da VEN em humanos é catalisada principalmente pelo CYP2D6 e que esta enzima age predominantemente na biotransformação da isoforma (-)-(R) (GEX-FABRY et al., 2002). Quando este fármaco foi co-administrado com a quinidina (inibidor de CYP2D6), houve a diminuição quase que total da formação da (-)-(R)-O-VEN (EAP et al., 2003).

Figura 2. Estruturas da venlafaxina e de seus metabólitos O-desmetilvenlafaxina, N-desmetilvenlafaxina e NO-didesmetilvenlafaxina.

A maioria dos métodos analíticos disponíveis para análise quiral da VEN e seus metabólitos em matrizes biológicas empregam a eletroforese capilar (CE) (Tabela 3). Rudaz et al. (2000) desenvolveram um método para determinação de VEN e O-VEN em plasma por CE empregando γ -ciclodextrina fosfatada como seletor quiral e LLE como técnica de preparação das amostras. Fanali et al. (2001) desenvolveram um método por eletrocromatografia capilar (CEC) com fase estacionária de vancomicina (antibiótico macrocíclico) e LLE na preparação das amostras para determinação da VEN e O-VEN em plasma.

A análise enantiosseletiva de VEN e seus metabólitos em matrizes biológicas por HPLC é descrita em apenas dois trabalhos. Wen et al. determinaram os enantiômeros da VEN e O-VEN em amostras de plasma empregando HPLC-ESI/MS

e a coluna Chirobiotic V em fase reversa; esses autores também utilizaram a LLE para preparar as amostras (WEN; FENG; HUAN-DE, 2007). A separação enantiosseletiva da VEN e seus três metabólitos (O-VEN, N-VEN e NO-VEN) em plasma é descrita em um único trabalho (KINGBÄCK et al., 2010) empregando HPLC-ESI/MS e SPE como técnica de preparação das amostras.

Até o momento não existem dados na literatura quanto à análise enantiosseletiva de VEN e seus metabólitos em matrizes biológicas utilizando HF-LPME como técnica de preparação das amostras.

A venlafaxina foi selecionada para este estudo por apresentar propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas estereosseletivas, sendo candidata potencial para vir a ser produzida na forma de enantiômeros puros. A realização de estudos de biotransformação estereosseletiva é essencial para dar suporte a essa importante decisão. Outro fator preponderante na escolha desse fármaco foi à carência de metodologias para análise enantiosseletiva, principalmente no que se refere ao emprego de técnicas de microextração.

Tabela 3. Resumo dos métodos quirais disponíveis para a determinação da VEN e seus metabólitos em matrizes biológicas.

Autores	Técnica	Descrição do método
Kingbäck et al., 2010	HPLC-ESI/MS	Resolução de VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN em plasma Fase estacionária: Vancomicina Fase Móvel: Tetrahidrofurano: Acetato de amônio 10 mmol L ⁻¹ pH 6,0 (10:90, v/v) Limite de quantificação: 1,0 ng mL ⁻¹ para VEN e O-VEN, 0,5 ng mL ⁻¹ para N-VEN e NO-VEN.
Wen; Feng; Huan-de, 2007	HPLC-ESI/MS	Resolução de VEN e O-VEN em plasma Fase estacionária: Vancomicina Fase Móvel: Acetato de amônio 30 mmol L ⁻¹ : Metanol (15:85, v/v) Recuperação: ~76% Limite de quantificação: 1,0 ng mL ⁻¹ (enantiômeros VEN) e 1,5 ng mL ⁻¹ (enantiômeros O-VEN)
Fanali et al., 2001	CEC-UV	Resolução de VEN e O-VEN em plasma Fase estacionária: Vancomicina Fase móvel: Acetato de amônio 100 mmol L ⁻¹ : Água: Acetonitrila (5:5:90, v/v/v) Limite de quantificação: 50,0 ng mL ⁻¹ Linearidade: 0,05 – 10,0 µg mL ⁻¹
Rudaz et al., 2000	CE-UV	Resolução de VEN e O-VEN em soro Seletor quiral: γ-ciclodextrina fosfatada Recuperação: > 75% Limite de quantificação: 25,0 ng mL ⁻¹ Linearidade: 25,0 – 500,0 ng mL ⁻¹
Wang et al., 1992	HPLC-UV	Resolução de VEN em plasma Fase estacionária: C18 Fase móvel: Acetonitrila: Fosfato de potássio 0,1 mol L ⁻¹ Agente de derivatização: cloreto de (+)-(S)-Naproxeno Linearidade: 50 – 5000 ng mL ⁻¹

2 - OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi avaliar a aplicabilidade da técnica de microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca no desenvolvimento de métodos de análise enantiosseletiva da venlafaxina e seus metabólitos em matrizes biológicas. Esse estudo também teve como objetivo avaliar a contribuição da estereosseletividade na biotransformação *in vitro* e *in vivo* da venlafaxina em ratos e humanos. Para atender esses objetivos, as seguintes etapas foram desenvolvidas:

- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para análise enantiosseletiva de venlafaxina e seus principais metabólitos (*N*-desmetilvenlafaxina / *N,O*-didesmetilvenlafaxina / *O*-desmetilvenlafaxina) em frações microssomais de fígado de ratos empregando a microextração em fase líquida com membranas cilíndricas ocas como técnica de preparação das amostras e HPLC com detecção por absorção no UV.
- Aplicação da nova metodologia em um estudo de biotransformação *in vitro* da venlafaxina.
- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para análise enantiosseletiva de venlafaxina e seus principais metabólitos (*N*-desmetilvenlafaxina / *N,O*-didesmetilvenlafaxina / *O*-desmetilvenlafaxina) em plasma empregando microextração em fase líquida com membranas cilíndricas ocas como técnica de preparação das amostras e cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral com detecção por espectrometria de massas (LC-MS-MS).
- Aplicação da nova metodologia em estudos pilotos de biotransformação *in vivo* da venlafaxina em ratos e humanos.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Otimização da resolução dos enantiômeros da VEN e seus metabólitos

3.1.1. Sistema cromatográfico

Foi utilizado um equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por uma bomba de duplo pistão, modelo LC-10AT-VP, um injetor Rheodyne (Cotati, CA, EUA), modelo 7125 com amostrador de 50 μL e um detector por absorção no UV-Vis, modelo SPD-10A VP. Para controle e aquisição dos dados foi empregado o software LC Solution da Shimadzu versão 1.22 SPI.

3.1.2 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados (grau cromatografia) foram: metanol, acetonitrila, hexano (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 2-propanol (EM Science, Gibbstown, NJ, EUA). Trietilamina (Acros Organics, Morris Plains, NJ, EUA) e dietilamina (DEA, Fluka, Buchs, Suíça), ambas grau p.a., foram empregadas como aditivos básicos. Ácido acético (Chemco, Campinas, SP, Brasil) e ácido trifluoracético (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) foram empregados como aditivos ácidos.

3.1.3 Soluções-padrão

Os padrões de VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN foram adquiridos de Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canadá). As soluções de VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN foram preparadas separadamente, em metanol, na concentração de 1 mg mL^{-1} do racemato, dissolvendo-se 2 mg do sal em balão volumétrico de 2 mL. Soluções-padrão de VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram obtidas por diluição apropriada.

3.1.4 Colunas quirais

As seguintes colunas foram avaliadas na resolução dos enantiômeros da VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN:

- Chiralpak AD-H (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.

- Chiralpak AD (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.

- Chiralcel OG (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado de celulose tris (4-metilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.

- Chiralpak AS (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado de amilose tris [(S)-1-feniletilcarbamato)] recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.

- Chiralcel OD-H (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado de celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.

- Chirobiotic T (150 x 4,6 mm, Advanced Separation Technologies, Whippany, NJ, EUA), constituída pelo antibiótico macrocíclico teicoplanina recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.

- Chirobiotic TAG (150 x 4,6 mm, Advanced Separation Technologies, Whippany, NJ, EUA), constituída pelo antibiótico macrocíclico teicoplanina aglicona recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.

- Chirobiotic V (150 x 4,6 mm, Advanced Separation Technologies, Whippany, NJ, EUA), constituída pelo antibiótico macrocíclico vancomicina recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.

Para avaliação das colunas cromatográficas, alíquotas de 25 µL das soluções padrões dos analitos na concentração de 50 µg mL⁻¹ foram transferidas para tubos cônicos de vidro. O solvente foi evaporado à secura sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 100 µL de fase móvel e 50 µL foram injetados no

sistema cromatográfico. A detecção foi feita em UV-Vis em 230 nm. As injeções foram feitas após o condicionamento da coluna com a fase móvel.

3.2 Análise enantiosseletiva de venlafaxina e seus metabólitos em microsomas de fígado de ratos empregando HF-LPME/LC-UVis

3.2.1 Análise cromatográfica

Foi utilizado o equipamento para cromatografia líquida descrito no item 3.1.1, com a coluna Chiralpak AD[®] e fase móvel constituída por hexano:2-propanol (95:5, v/v) + 0,025% de DEA. Uma coluna de guarda CN Lichrospher 100 (4 mm x 4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) constituída de partículas de 5 µm de diâmetro de sílica modificada com grupos cianopropil, foi empregada para proteção da coluna analítica. A procedência dos solventes e reagentes foi a mesma informada no item 3.1.2.

3.2.2 Soluções-padrão

As soluções de VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN (procedência informada no item 3.1.3) foram preparadas separadamente, em metanol, na concentração de 1 mg mL⁻¹ do racemato, dissolvendo-se 2 mg do sal em balão volumétrico de 2 mL. Soluções-padrão de VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN nas concentrações de 8, 20, 40, 50, 60, 120 e 200 µg mL⁻¹ de cada enantiômero foram obtidas por diluição apropriada.

3.2.3. Preparação das amostras

3.2.3.1 Equipamentos

Um agitador Ika Vibrax (modelo VXR basic, Staufen, Alemanha) foi usado nos experimentos empregando a HF-LPME. Um peagâmetro da marca Corning, modelo 430 (Nova Iorque, NY, EUA) foi usado para as aferições de pH das soluções aquosas. Um sistema de purificação de água, Milli-Q plus Millipore/Millipore

Corporation (Bedford, MA, EUA) forneceu água livre de resíduos orgânicos e inorgânicos para preparação das soluções.

3.2.3.2. Reagentes e solventes

Os reagentes (grau analítico) empregados na preparação das soluções foram: fosfato monossódico monohidratado e fosfato dissódico dihidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), hidróxido de sódio e ácido perclórico (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil), ácido trifluoracético (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) e ácido acético (Chemco, Campinas, SP, Brasil). Os solventes grau p.a. impregnados na membrana foram: éter n-hexílico (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, EUA), 1-octanol (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e acetato de dodecila (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

As extrações foram feitas empregando-se membrana hidrofóbica de 15 cm de comprimento com um diâmetro interno de 600 μm , parede com espessura de 200 μm e poros de 0,2 μm (Q3/2 Accurel PP, Membrana, Wuppertal, Alemanha).

3.2.3.3. Otimização das condições de extração por HF-LPME para determinação da VEN e seus metabólitos no meio de incubação.

O meio de incubação empregado na otimização das condições de extração da HF-LPME era composto por 50 μL de fração microssomal de fígado de ratos e 950 mL de tampão fosfato 1 mol L^{-1} pH 7,4. Na primeira etapa de otimização do procedimento de extração empregando HF-LPME, analisou-se a influência do solvente orgânico e da fase aceptora na extração da VEN e seus metabólitos. Foram investigados 3 solventes orgânicos (1-octanol, éter n-hexílico e acetato de dodecila) e 3 fases aceptoras (ácido trifluoracético 0,1 mol L^{-1} , ácido acético 0,1 mol L^{-1} e ácido perclórico 0,1 mol L^{-1}). Para avaliar todas as interações possíveis entre estes 2 fatores nos 3 níveis determinados, delineou-se um planejamento fatorial completo com 3^2 experimentos (Tabela 4). Para estes testes preliminares, foram empregadas amostras de 1 mL de meio de incubação fortificadas com solução-padrão de VEN e de seus metabólitos na concentração de 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada enantiômero. O comprimento da membrana foi de 15 cm, o pH da fase doadora foi ajustado para 10 com 0,3 mL de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} e as extrações foram feitas durante 30 minutos com agitação de 1000 rpm.

Tabela 4. Experimentos realizados para avaliar a influência de diferentes solventes orgânicos e fasesceptoras na extração da VEN e seus metabólitos por HF-LPME.

Variáveis	Níveis selecionados		
Solvente	1-octanol	éter <i>n</i> -hexílico	Acetato de dodecila
Fase aceptora	Ácido trifluoracético	Ácido acético	Ácido perclórico
Experimento	Combinações		
1	1-octanol	Ácido trifluoracético	
2	éter <i>n</i> -hexílico	Ácido trifluoracético	
3	acetato de dodecila	Ácido trifluoracético	
4	1-octanol	Ácido acético	
5	éter <i>n</i> -hexílico	Ácido acético	
6	acetato de dodecila	Ácido acético	
7	1-octanol	Ácido perclórico	
8	éter <i>n</i> -hexílico	Ácido perclórico	
9	acetato de dodecila	Ácido perclórico	

Em uma segunda etapa avaliou-se a influência dos demais fatores (tempo de extração, agitação, pH da fase doadora e concentração do ácido da fase aceptora) através de um planejamento fatorial fracionado com 8 experimentos (Tabelas 5 e 6), realizados em duplicata. Os resultados deste estudo foram plotados empregando o programa estatístico Minitab versão 14 (INC State College, PA, EUA).

Tabela 5. Fatores estudados no planejamento fatorial fracionado.

Fator	Nível			
	Baixo		Alto	
Tempo de extração (min)	20	(A)	40	(a)
Concentração de ácido na fase aceptora (mol L ⁻¹)	0,01	(B)	0,1	(b)
Velocidade de agitação (rpm)	1000	(C)	1500	(c)
pH da fase doadora	10	(D)	12	(d)

Tabela 6. Testes realizados no planejamento fatorial fracionado.

Fator	Combinações							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	b	B	b	B	b	B	b
C ou c	C	C	c	c	c	c	C	C
D ou d	D	d	D	d	d	D	d	D
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Em função dos resultados dos estudos anteriores, delineou-se novo planejamento fatorial com 4 experimentos (Tabela 7) para determinar a interação dos parâmetros: força do ácido da fase aceptora e agitação do sistema.

Tabela 7. Testes realizados para avaliar a interação entre os fatores força da fase aceptora e agitação do sistema na extração da VEN e de seus metabólitos.

Experimento	Combinações	
	<i>Fase aceptora</i>	<i>Agitação</i>
1	Acido acético 0,1 mol L ⁻¹	1750 rpm
2	Acido acético 0,1 mol L ⁻¹	1000 rpm
3	Acido acético 0,5 mol L ⁻¹	1750 rpm
4	Acido acético 0,5 mol L ⁻¹	1000 rpm

Para reduzir os cálculos nos ensaios dos planejamentos experimentais, foram consideradas como áreas da VEN, O-VEN e N-VEN a soma das áreas dos enantiômeros 1 e 2.

3.2.4 Validação do método

3.2.4.1. Curva analítica e linearidade

No estudo de biotransformação *in vitro* da VEN com microsomas de ratos avaliou-se a formação dos metabólitos O-VEN e N-VEN, por este motivo a validação do método se restringiu a estes dois metabólitos.

Para obtenção da curva analítica, alíquotas de 25 µL das soluções-padrão racêmicas de O-VEN e N-VEN foram transferidas, em triplicata, para frascos de 4 mL. O metanol foi eliminado por evaporação sob fluxo de ar comprimido e, em seguida, adicionou-se a fração microssomal e tampão fosfato 1 mol L⁻¹ pH 7,4 até volume de 1,0 mL (mistura denominada meio de incubação). As concentrações dos enantiômeros da O-VEN e N-VEN no meio de incubação foram 200, 500, 1000, 1500, 3000 e 5000 ng mL⁻¹. As amostras foram extraídas e analisadas.

As curvas analíticas foram construídas relacionando as áreas dos picos *versus* suas respectivas concentrações. A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem ($y = ax + b$). A faixa linear foi calculada empregando o coeficiente de determinação (r^2), definindo a menor concentração como o mais baixo calibrador e removendo os calibradores mais altos até que fosse encontrado um coeficiente acima de 0,98 (Anvisa, Resolução RE nº 899, 2003).

3.2.4.2. Recuperação

Para avaliar a eficiência da extração, as áreas obtidas de amostras de meio de incubação fortificadas com três concentrações dos metabólitos e submetidas ao procedimento de extração foram comparadas com as áreas obtidas de soluções-padrão dos metabólitos na fase móvel. Alíquotas de 25 µL das soluções-padrão O-VEN e N-VEN nas concentrações de 20, 60 e 120 µg mL⁻¹ de cada enantiômero, o que corresponde a concentrações de 500, 1500 e 3000 ng por mL de meio de incubação, foram transferidas para tubos cônicos, o solvente foi evaporado até a secura sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos na fase móvel e analisados. Em seguida, alíquotas do meio de incubação fortificadas com

concentrações idênticas às anteriores foram analisadas após terem sido submetidas ao processo de extração.

A recuperação foi calculada usando a relação das áreas das amostras extraídas e não extraídas (ANVISA, 2003):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área dos picos na amostra submetida à extração}}{\text{Área dos picos na amostra não submetida à extração}} \times 100$$

As estimativas dos desvios padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) foram calculados para cada concentração.

3.2.4.3 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através de estudos intra e interensaios. Amostras de meio de incubação foram fortificadas com a O-VEN e N-VEN nas concentrações de 500, 1500 e 3000 ng de cada enantiômero por mL de meio de incubação.

Para os estudos de precisão e exatidão intra-ensaio, cinco alíquotas de cada concentração foram analisadas no mesmo dia. Para os estudos da precisão e exatidão interensaios, foram consideradas 3 concentrações diferentes, em quintuplicata, em 3 dias diferentes. As concentrações dos analitos nas amostras foram determinadas a partir de curvas analíticas da O-VEN e N-VEN preparadas diariamente nas mesmas condições descritas em 3.2.4.1.

A precisão é expressa como estimativa do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a equação (ANVISA, 2003):

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

DP é a estimativa do desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

A exatidão é expressa em porcentagem do erro relativo, através da equação:

$$\text{Exatidão (\% de erro)} = \frac{\text{Valor obtido} - \text{Valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

3.2.4.4 Limite de quantificação

Para avaliação dos limites de quantificação, 5 amostras do meio de incubação fortificadas com 200 ng mL⁻¹ de cada enantiômero da O-VEN e N-VEN foram submetidas ao processo de extração e analisadas. As concentrações dos analitos nas amostras foram determinadas a partir das curvas analíticas da O-VEN e N-VEN preparadas nas mesmas condições descritas em 3.2.4.1.

3.2.4.5 Estabilidade

O estudo de estabilidade da O-VEN e N-VEN foi avaliado inicialmente durante ciclos de congelamento e descongelamento (3 ciclos), empregando-se 3 amostras na concentração baixa (500 ng de cada enantiômero por mL de meio de incubação) e 3 amostras na concentração alta (3000 ng de cada enantiômero por mL de meio de incubação). Neste estudo, as amostras foram congeladas a – 20°C por 24 horas e então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a – 20°C, por 12 horas, e assim, sucessivamente, até completar os três ciclos, quantificando-se a O-VEN e N-VEN nas amostras após o terceiro ciclo. Os valores de áreas dos picos foram comparados com valores obtidos de amostras frescas, calculando-se os erros relativos.

$$\% \text{ de erro} = \frac{\text{Valor obtido} - \text{Valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

A estabilidade dos analitos a temperatura ambiente também foi avaliada empregando 3 amostras dos meios de incubação nas concentrações baixa e alta (500 e 3000 ng de cada enantiômero por mL de meio de incubação, respectivamente), as quais foram submetidas ao descongelamento natural, a

temperatura ambiente e mantidas durante 12 horas sobre a bancada de trabalho. Após este tempo, as amostras foram quantificadas e novamente os valores foram comparados com valores obtidos de amostras frescas.

Finalmente, avaliou-se a estabilidade durante o procedimento de incubação. Para este estudo também foram empregadas 3 amostras das concentrações baixa e alta, as quais foram submetidas ao procedimento de incubação em banho maria a 37°C por 60 min. Após este tempo, as amostras foram quantificadas e novamente os valores foram comparados com valores obtidos de amostras frescas.

3.2.4.6 Robustez

Para este estudo foram empregadas alíquotas de 25 µL da solução-padrão de O-VEN e N-VEN na concentração de 60 µg mL⁻¹ de cada enantiômero. Estas soluções foram transferidas para tubos cônicos, o solvente foi evaporado até a secura sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos na fase móvel e analisados.

Para se avaliar a robustez do método foram feitas pequenas variações na vazão (0,9 e 1,1 mL min⁻¹), composição da fase móvel (hexano: 2-propanol 94:6 + 0,025% de DEA e hexano: 2-propanol 96:4 + 0,025% de DEA) e temperatura do ambiente de trabalho (22 e 25°C). Foram comparados os valores de resolução (Rs) e fator de separação (α) entre a condição inicial e as condições a que o método foi submetido.

3.2.5. Aplicação do método HF-LPME/LC-UV_{vis} em um estudo de biotransformação empregando microssomas de fígado de ratos

3.2.5.1 Equipamentos

Um homogeneizador do tipo “Potter”, modelo MA 181 (Marconi, São Paulo, SP, Brasil) foi empregado para a homogeneização dos fígados dos animais. Para as centrifugações empregou-se centrífuga modelo HIMAC CF 15D2 (Hitachi, Tóquio, Japão) e ultra-centrífuga Beckman, modelo XL-70 (Fullerton, CA, EUA). A quantificação das proteínas nas amostras foi realizada em um espectrofotômetro Spectronic 20 Genesystm (Spectronic instruments, Nova Iorque, NY, EUA). As

incubações foram realizadas em um banho com agitação, modelo MA093 (Marconi, São Paulo, SP, Brasil).

3.2.5.2 Reagentes e solventes

O Hepes empregado na preparação da solução tampão foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As substâncias β -Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADP), glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase foram obtidas da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Foram empregados cloreto de potássio da Nuclear (São Paulo, SP, Brasil), ácido clorídrico da Chemco (Campinas, SP, Brasil), glicerol e tris (base) (hidroximetil)aminometano da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) da Carlo Erba (Milão, Itália). Para a determinação de proteínas totais na fração microssomal foi utilizado KIT Gold Analisa (Belo Horizonte, MG, Brasil) contendo padrão de soro-albumina bovina e solução de biureto.

3.2.5.3 Animais

Os animais (ratos Wistar machos, pesando de 180 a 250 g) foram obtidos do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Segue anexada (Anexo A) uma cópia do documento de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

3.2.5.4 Isolamento da fração microssomal do fígado de ratos

Os animais, ambientados a 25°C com ciclos de luz de 12 horas foram submetidos a jejum na noite anterior aos experimentos. O fígado foi retirado (após decaptação), picado em pequenos pedaços e lavado com solução tampão tris-HCl 50 mmol L⁻¹/ KCl 0,154 mol L⁻¹ pH 7,4. Em seguida, o fígado foi adicionado de aproximadamente 20 mL de tampão tris-HCl 50 mmol L⁻¹/ KCl 0,154 mol L⁻¹ pH 7,4 e triturado em homogeneizador tipo “Potter” em 3 ciclos, sendo que cada ciclo compreende 3 triturações de um minuto com velocidade de 1000 rpm. Posteriormente, houve o isolamento da fração microssomal de acordo com o procedimento representado na Figura 3 (LAKE, 1987).

3.2.5.5 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas na fração microssomal foi determinada de acordo com o procedimento mostrado na Tabela 8.

Tabela 8. Procedimento para dosagem de proteínas.

	Branco	Teste	Padrão
Água destilada	20 µL	-----	-----
Amostra	-----	20 µL	-----
Padrão ^a	-----	-----	20 µL
Biureto ^b	1000 µL	1000 µL	1000 µL

^a Soro-albumina bovina

^b Sulfato de cobre pentahidratado 0,15% e tartarato de sódio e potássio 0,6% em hidróxido de sódio 0,75 mol L⁻¹

Após o preparo, as amostras foram homogeneizadas e deixadas por 10 min à temperatura ambiente e, em seguida, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro *UV-Vis*, no comprimento de onda de 545 nm. A concentração de proteínas foi calculada segundo as equações:

$$F_c = \frac{C_p}{A_p} \quad C_t = F_c \times A_t \times 10 \text{ (proteínas em mg mL}^{-1}\text{)}$$

Onde F_c é o Fator de correção, C_p concentração de proteínas do padrão, A_p absorbância do padrão, C_t concentração de proteínas do teste e A_t absorbância do teste.

Figura 3. Procedimento de isolamento da fração microssomal a partir do homogeneizado de fígado.

3.2.5.6 Procedimento de incubação

Para a incubação foram utilizados tubos cônicos. Inicialmente a solução da VEN era adicionada aos tubos e o metanol era evaporado a secura sob fluxo de ar comprimido. Posteriormente, adicionava-se 250 µL da solução NRS (*NADPH regenerating system*) contendo NADP (1,7 mg mL⁻¹), glicose-6-fosfato (7,8 mg mL⁻¹) e glicose-6-fosfato desidrogenase (1,5 unidades) em solução tampão tris-HCl 50 mmol L⁻¹/ KCl 0,154 mol L⁻¹ pH 7,4. Finalmente, a fração microssomal do fígado de rato era acrescentada e completava-se o volume do meio de incubação (1 mL) com tampão fosfato 1 mol L⁻¹ pH 7,4. A incubação era realizada sob agitação a 37°C.

Depois de decorrido o tempo de incubação, a reação era encerrada com a adição de 400 μL de ácido perclórico 6% (v/v).

Foram otimizados o tempo de incubação, a concentração de proteínas no meio de incubação e a concentração da rac-VEN empregada. Inicialmente foram empregados 25 μL da solução da VEN 1,0 mg mL^{-1} , 30 minutos de incubação e a concentração de proteínas da fração microssomal no meio de incubação foi variada (1, 2, 4 e 6 mg mL^{-1}). Em seguida variou-se o tempo de incubação (5, 15, 30 e 60 minutos) e, por último, a concentração do substrato (VEN) no meio de incubação (36, 90, 180, 360mM).

3.3 Análise enantiosseletiva de venlafaxina e seus metabólitos em plasma empregando HF-LPME/LC-MS-MS

3.3.1 Análise cromatográfica

3.3.1.1 Sistema cromatográfico

Foi utilizado o equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por uma bomba de duplo pistão, modelo LC-10AD, forno modelo CTO-10AS VS, injetor Rheodyne (Cotati, CA, EUA), modelo 7125 com amostrador de 50 μL e um sistema controlador modelo SCL-10A VP. Com o objetivo de minimizar a supressão da ionização causada pela presença de DEA na fase móvel, uma solução de ácido acético 0,2% foi adicionada pós-coluna empregando uma bomba auxiliar do mesmo modelo descrito acima, operando na vazão de 0,1 mL min^{-1} .

O sistema de detecção por MS utilizado foi o Quattro LC Triplo Quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com interface Z-ESI. As análises foram executadas no modo positivo. O efluente do sistema cromatográfico foi dividido por uma válvula (Upchurch, Scientific, Oak Harbor, EUA) e aproximadamente 0,1 mL min^{-1} foi introduzida no MS. O nitrogênio foi empregado como gás de secagem e nebulização e o argônio como gás de colisão. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram de 80°C e 250°C, respectivamente. Para a aquisição e tratamento dos dados foi empregado o programa MassLynx, versão 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

As condições do espectrômetro de massas foram otimizadas pela infusão direta de soluções de *rac*-VEN, *rac*-O-VEN, *rac*-N-VEN e *rac*-NO-VEN e do padrão interno (atenolol) preparadas na fase móvel, na vazão de 20 $\mu\text{L min}^{-1}$. A quantificação foi conduzida por MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) das moléculas protonadas ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e seus respectivos fragmentos. As condições otimizadas para cada analito estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9. Íons precursores e respectivos produtos monitorados em MRM.

Analito	Reação monitorada			Voltagem do cone (kV)	Energia de colisão (eV)
VEN	278	→	260	25	15
O-VEN	264	→	246	25	15
N-VEN	264	→	215	30	17
NO-VEN	250	→	232	27	12
Atenolol	266	→	145	35	27

3.3.1.2 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados na composição da fase móvel (grau cromatografia) foram metanol (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) e etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha). Dietilamina (DEA) (Fluka, Buchs, Suíça) e ácido acético (Chemco, Campinas, SP, Brasil) foram empregados como aditivo básico e ácido, respectivamente.

3.3.1.3 Coluna quirál e coluna de guarda

Para a resolução dos enantiômeros da VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN foi utilizada a coluna Chiralpak AD-H (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado de amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) recobrimo partículas de sílica de 5 μm de diâmetro.

A coluna de guarda empregada foi a CN Lichrospher 100 (4 mm x 4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) constituída de partículas de 5 μm de diâmetro de sílica modificada com grupos cianopropil.

3.3.1.4 Soluções-padrão

Como informado no item 3.1.3, os padrões de VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN foram adquiridos de Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canadá). Soluções estoque de VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN foram preparadas separadamente, em metanol, na concentração de 1 mg mL^{-1} do racemato e soluções de trabalho nas concentrações de 0,2, 0,5, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 e $20,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada enantiômero foram obtidas por diluição apropriada.

3.3.2 Preparação das amostras

3.3.2.1 Equipamentos, reagentes e solventes

Para a realização dos experimentos empregando a HF-LPME foram empregados os mesmos equipamentos, reagentes e solventes descritos nos itens 3.1.1 e 3.1.2.

3.3.2.2 Amostras de plasma

No desenvolvimento e validação da metodologia analítica foram empregadas amostras de plasma humano livres dos analitos, obtidas no Hemocentro do Hospital São Francisco de Ribeirão Preto, armazenadas a -20°C até o momento da análise.

Amostras de plasma de ratos foram obtidas dos animais sacrificados no estudo de biotransformação empregando microssomas. Estas amostras foram utilizadas apenas para avaliar se havia diferenças entre o plasma de rato e humano que poderiam interferir no método desenvolvido.

As amostras de plasma eram descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas para remoção de partículas suspensas durante 10 minutos a $2000 g$.

3.3.2.3 Otimização das condições de extração por HF-LPME para a determinação da VEN e seus metabólitos em amostras de plasma

Para otimizar o procedimento de extração dos analitos por HF-LPME em plasma foi montado um planejamento fatorial fracionado com 8 experimentos

(Tabelas 10 e 11) e os seguintes parâmetros foram avaliados: tempo de extração, agitação da amostra, pH da fase doadora, presença de sal na fase doadora e concentração do ácido da fase aceptora. Os resultados deste estudo foram plotados empregando o programa estatístico Minitab versão 14 (INC State College, PA, EUA).

Tabela 10. Fatores estudados no planejamento fatorial fracionado do procedimento de extração da VEN e seus metabólitos de plasma empregando HF-LPME.

Fator	Nível	
	Baixa	Alto
Tempo de extração (min)	20 (A)	40 (a)
Concentração de ácido na fase aceptora (mol L ⁻¹)	0,1 (B)	0,5 (b)
Velocidade de agitação (rpm)	1000 (C)	1750 (c)
pH da fase doadora	10 (D)	14 (d)
NaCl (%)	0 (E)	10 (e)

Tabela 11. Testes realizados no planejamento fatorial fracionado do procedimento de extração da VEN e seus metabólitos de plasma empregando HF-LPME.

Fator	Combinações							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	A	a	a	a
B ou b	B	b	B	b	B	b	B	b
C ou c	C	C	c	c	C	c	C	C
D ou d	D	d	D	d	D	D	d	D
E ou e	E	e	e	E	E	e	e	E
Resultado	s	t	u	v	W	x	y	z

3.3.3 Validação do método

Após serem definidas as condições de extração, o método analítico foi validado visando à aplicação em um estudo de disposição cinética da VEN. Em função da baixa detectabilidade do método para o metabólito NO-VEN, o método foi validado apenas para os demais metabólitos (O-VEN e N-VEN) e para a VEN. A validação foi feita empregando o mesmo procedimento descrito no item 3.2.4. Detalhes referentes a esta etapa são descritos na Tabela 12.

Tabela 12. Concentrações avaliadas na validação do método de análise dos enantiômeros da VEN, O-VEN e N-VEN em plasma.

Parâmetro	Concentração dos enantiômeros da VEN, N- VEN e O-VEN (ng mL ⁻¹)
Linearidade	5, 12,5, 50, 250, 375 e 500
Limite de quantificação	5
Recuperação	12,5, 250 e 375
Precisão e exatidão	12,5, 250 e 375
Estabilidade	12,5, 375

Para contornar a supressão da ionização sem, contudo, interferir na resolução dos picos dos analitos foi realizada infusões pós-coluna de soluções de ácido acético em diferentes concentrações (0,1 – 0,5%) e em diferentes vazões (0,1 – 0,3 mL min⁻¹).

3.3.4 Aplicação do método de LPME/LC–MS–MS em estudos de disposição cinética

Com a finalidade de avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido e validado, foram delineados dois estudos pilotos de disposição cinética, sendo um em humanos e outro em ratos.

3.3.4.1 Disposição cinética em ratos

Os animais utilizados neste experimento foram da mesma espécie e procedência e tiveram o mesmo tratamento descrito no item 3.2.5.3.

Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, recebendo apenas água e, ao final deste período, os animais receberam uma solução aquosa (0,5 mL) de VEN na concentração 75 mg Kg⁻¹ por via oral (gavagem). Após uma hora da administração do fármaco, os animais puderam se alimentar normalmente.

As amostras de sangue (~ 4 mL) foram coletadas após a decaptação dos animais nos tempos: 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 horas após a administração ($n = 3$ para

cada tempo de coleta), utilizando-se heparina (Liquemine 25.000 UI, Roche) como anticoagulante. Os plasmas obtidos por centrifugação (2000 *g* por 15 min) foram armazenados a -20°C ao abrigo da luz até o momento do preparo das amostras para análise.

O estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto, conforme certificado no Anexo A.

3.3.4.2 Disposição cinética em humanos

A avaliação da disposição cinética em humanos foi realizada em uma voluntária sadia, sexo feminino, 28 anos de idade e 53 Kg. Após 12 horas de jejum, a voluntária recebeu uma dose de 75 mg de *rac*-VEN (Efexor[®], Wyeth). As amostras de sangue (~ 8 mL) foram coletadas imediatamente antes da administração e nos tempos: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 12,0 e 24,0 horas após a administração. Os plasmas obtidos por centrifugação (2000 *g* por 15 min) foram armazenados a -20°C ao abrigo da luz até o momento do preparo das amostras para análise. A voluntária previamente informada e esclarecida a respeito do estudo consentiu, por escrito, em participar da investigação, a qual foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (Anexo B).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização da separação dos enantiômeros

O objetivo desta etapa foi obter a separação simultânea dos enantiômeros da VEN e seus metabólitos (N-VEN, O-VEN e NO-VEN). Foram avaliadas colunas quirais baseadas em antibióticos macrocíclicos e colunas quirais baseadas em polissacarídeos, empregando os modos de eluição normal e polar orgânico.

4.1.1 Colunas baseadas em antibióticos macrocíclicos

As colunas de antibióticos macrocíclicos podem ser empregadas em todos os modos de eluição (normal, reverso e polar orgânico), demonstrando diferenças enantiosseletivas entre eles, o que permite separar uma grande variedade de compostos quirais. Estas colunas têm demonstrado boa capacidade de discriminação quiral quando empregadas com fases móveis compostas de misturas de solventes orgânicos polares (modo de eluição polar orgânico). O emprego desse tipo de fase móvel favorece a solubilização de ampla variedade de compostos químicos e também facilita o acoplamento com o detector MS (ABOUL-ENEIN; ALI, 2002). Por estes motivos, este modo de eluição foi selecionado durante o desenvolvimento do método nestas colunas. As fases móveis empregadas eram constituídas por solventes orgânicos polares (metanol, acetonitrila ou etanol) ou misturas desses solventes. A influência da presença de aditivos básicos (dietilamina - DEA e trietilamina - TEA) e/ou ácidos (ácido acético - AA e trifluoracético - TFA) na fase móvel era avaliada para cada coluna empregada. A influência da vazão da fase móvel na resolução dos picos também foi avaliada para todas as colunas testadas.

4.1.1.1 Coluna Chirobiotic T[®] e coluna Chirobiotic TAG[®]

A coluna Chirobiotic T[®] tem como seletor quiral o antibiótico macrocíclico teicoplanina, enquanto que na coluna Chirobiotic TAG[®], o seletor quiral é a teicoplanina aglicona, que é resultante da remoção de três moléculas de açúcar da teicoplanina. A remoção das três moléculas de açúcar faz com que a coluna Chirobiotic TAG[®] apresente um aumento na capacidade de resolução de vários

aminoácidos e de compostos neutros. Não foi possível obter resolução dos compostos em nenhuma das condições avaliadas na coluna Chirobiotic T[®]. Dentre as várias condições cromatográficas avaliadas com a coluna Chirobiotic TAG[®], a que possibilitou as melhores resoluções dos enantiômeros da VEN, O-VEN e NO-VEN foi a que empregou a fase móvel constituída por metanol:acetonitrila (50:50, v/v) adicionada de 0,1% de DEA, na vazão de 0,5 mL min⁻¹. Infelizmente, essa condição não permitiu obter a separação completa dos enantiômeros destes compostos (Figura 4). A N-VEN não apresentou interação enantiosseletiva com esta fase estacionária em nenhuma das condições avaliadas.

Figura 4. Cromatograma da VEN, O-VEN, N-VEN, e NO-VEN na coluna Chirobiotic TAG[®]. Condições cromatográficas: fase móvel constituída por metanol:acetonitrila (50:50, v/v) + 0,1% de DEA na vazão de 0,5 mL min⁻¹. Detecção em 230 nm.

4.1.1.2 Coluna Chirobiotic V[®]

A coluna Chirobiotic V[®] também foi avaliada no modo polar orgânico de eluição. Dentre as várias condições cromatográficas avaliadas, a que possibilitou as melhores resoluções dos enantiômeros da VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN foi a que empregou como fase móvel a mistura de etanol:metanol (70:30, v/v) adicionada de 0,025% de DEA e 0,2% de ácido acético, na vazão de 0,4 mL min⁻¹ (Figura 5).

Figura 5. Cromatograma da VEN, O-VEN, N-VEN, e NO-VEN na coluna Chirobiotic V[®]. Condições cromatográficas: fase móvel constituída por etanol:metanol (70:30, v/v) + 0,025% de DEA + 0,2% de ácido acético na vazão de 0,4 mL min⁻¹. Detecção em 230 nm.

Como nenhuma das colunas quirais baseadas em antibióticos macrocíclicos avaliadas no modo polar orgânico propiciou a separação completa dos enantiômeros da VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN, partiu-se, então, para o emprego de colunas baseadas em derivados de polissacarídeos.

4.1.2 Colunas baseadas em derivados de polissacarídeos

A grande vantagem das CSPs baseadas em derivados de polissacarídeos é que uma maior variedade de classes de compostos quirais pode ser eficientemente resolvida (LLISZ; BERKECZ; PÉTER, 2009). Os derivados mais utilizados são os tris-benzoatos e tris-fenilcarbamatos de celulose (colunas Chiralcel[®]) e amilose (colunas Chiralpak[®]). Embora as colunas baseadas em derivados de polissacarídeos sejam comumente empregadas no modo normal de eluição da fase móvel, com misturas de um solvente alifático (hexano, pentano, heptano) e alcoóis, elas têm sido usadas também nos modos reverso e polar orgânico (ABOUL-ENEIN; ALI, 2002; BONATO; JABOR; GATANI, 2005).

Existem diversos parâmetros que controlam a resolução quiral neste tipo de coluna, porém os mais importantes são: composição e pH da fase móvel, vazão e temperatura. O pH da fase móvel tem maior significância quando se trata de separações empregando fase reversa (MITCHELL; BENZ; ZHNG, 2008; ABOUL-ENEIN; ALI, 2002).

Para os estudos empregando as colunas baseadas em derivados de polissacarídeos foram avaliados os modos normal e polar orgânico de eluição, sendo a escolha do modo de eluição dependente da disponibilidade da coluna cromatográfica no laboratório no momento em que os testes foram realizados. A interferência da vazão da fase móvel na resolução dos picos foi investigada em algumas situações e a temperatura da coluna cromatográfica foi a mesma para todas as análises (temperatura ambiente, $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

4.1.2.1 Coluna Chiralcel OG[®]

O seletor quiral na coluna Chiralcel OG[®] é o derivado de celulose tris (4-metilfenilcarbamato). Os experimentos realizados com essa coluna foram feitos no modo de eluição normal. Dentre as várias fases móveis avaliadas, a que possibilitou as melhores resoluções dos enantiômeros da O-VEN, N-VEN e NO-VEN foi a constituída pela mistura de hexano:etanol:2-propanol (95:3:2, v/v/v) adicionada de 0,1% de DEA e 0,1% de ácido acético (Figura 6). A VEN não apresentou interação enantiosseletiva com esta fase estacionária em nenhuma das condições avaliadas.

Figura 6. Cromatogramas da VEN, O-VEN, N-VEN, e NO-VEN na coluna Chiralcel OG®. Condições cromatográficas: fase móvel constituída por hexano:etanol:2-propanol (95:3:2, v/v/v) + 0,1% de DEA + 0,1% de ácido acético, vazão de 0,8 mL min⁻¹. Detecção em 230 nm.

4.1.2.2 Coluna Chiralpak AD-H®

A coluna Chiralpak AD-H® é constituída pelo seletor quiral amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) incorporado em partículas de sílica de 5 µm. Os experimentos realizados com esta coluna foram feitos no modo de eluição polar orgânico. A fase móvel que resultou na melhor separação dos enantiômeros da VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN foi a constituída por metanol:etanol (70:30, v/v) + 0,025% de DEA na vazão de 0,5 mL min⁻¹ (Figura 7).

Figura 7. Cromatogramas da VEN e O-VEN (A) e N-VEN e NO-VEN (B) na coluna Chiralpak AD-H[®]. Condições cromatográficas: fase móvel constituída por metanol:etanol (70:30, v/v) + 0,025% de DEA na vazão de 0,5 mL min⁻¹. Detecção em 230 nm.

4.1.2.3 Coluna Chiralpak AD[®]

A coluna Chiralpak AD[®] apresenta como seletor quiral o mesmo derivado presente na coluna Chiralpak AD-H[®]; as diferenças entre estas colunas estão relacionadas ao diâmetro das partículas da sílica (5 μ m na coluna Chiralpak AD-H[®]

e 10 μm na coluna Chiralpak AD[®]) e ao comprimento da coluna (15 cm na coluna Chiralpak AD-H[®] e 25 cm na coluna Chiralpak AD[®]). A coluna Chiralpak AD-H[®], por ter menor diâmetro das partículas, apresenta, usualmente, maior eficiência na separação dos analitos.

Os experimentos realizados com a coluna Chiralpak AD[®] empregaram o modo de eluição normal. Dentre as várias condições cromatográficas avaliadas, a que possibilitou as melhores resoluções dos enantiômeros da VEN, O-VEN e N-VEN foi a que empregou a fase móvel constituída por hexano:2-propanol (95:5, v/v) adicionada de 0,025% de DEA, na vazão de 1,0 mL min⁻¹ (Figura 8). Os enantiômeros da NO-VEN não eluíram desta coluna em nenhuma das condições avaliadas.

Figura 8. Cromatograma da VEN, O-VEN e N-VEN na coluna Chiralpak AD[®], Condições cromatográficas: fase móvel constituída por hexano:2-propanol (95:5, v/v) + 0,025% de DEA, na vazão de 1,0 mL min⁻¹. Detecção em 230 nm.

4.1.2.4 Outras colunas avaliadas

A coluna Chiralcel OD-H[®] apresenta como seletor quiral o derivado celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) incorporado em partículas de sílica de 5 μm . Esta

coluna apresenta habilidade em resolver uma variedade de compostos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos, compostos que contém metais, compostos com grupos ciano, carbonila e ácidos carboxílicos. O principal sítio de reconhecimento são os resíduos de carbamatos próximos às unidades de glicose (OKAMOTO; KAIDA, 1994).

Os experimentos realizados com a coluna Chiralcel OD-H® foram feitos nos modos de eluição normal e polar orgânico, porém não foi observada interação enantiosseletiva da VEN e de seus metabólitos em nenhuma das condições avaliadas.

A coluna Chiralpak AS® apresenta o derivado amilose tris [(S)-1-feniletilcarbamato)] como seletor quiral. Compostos que possuem grupos carbonilas e não podem ser bem resolvidos nas colunas Chiralpak AD® Chiralcel OD® têm sido resolvidos nesta coluna. O reconhecimento quiral depende da natureza dos substituintes do grupo fenil (OKAMOTO; KAIDA, 1994).

Os experimentos realizados com a coluna Chiralpak AS® empregaram o modo de eluição normal, porém não foi observada interação enantiosseletiva da VEN e de seus metabólitos em nenhuma das condições avaliadas.

4.1.3 Comparação das colunas quirais

Os parâmetros apresentados pelas colunas quirais baseadas em antibióticos macrocíclicos e derivados de polissacarídeos nas condições que resultaram nas melhores separações dos enantiômeros da VEN e seus metabólitos estão listados nas Tabelas 13 e 14. A presença do aditivo básico DEA foi fundamental para a eluição dos analitos das colunas em tempos adequados. Todas as colunas são preparadas pela incorporação ou ligação do seletor quiral a partículas de sílica e como essa incorporação/ligação não é completa, ainda sobram grupos silanóis residuais que podem interagir com os solutos básicos. Os aditivos básicos presentes na fase móvel competem, desta forma, com os analitos pelos grupos silanóis residuais, reduzindo a retenção dos analitos básicos na coluna cromatográfica. Os ácidos orgânicos, quando presentes na fase móvel também reduzem a retenção dos analitos básicos devido à formação de pares iônicos com estes compostos. (TANG; 1996)

Tabela 13. Comparação dos resultados obtidos com as colunas quirais baseadas em antibióticos macrocíclicos.

Coluna	Fase móvel	V (mL min ⁻¹)	t _R (min)	Rs ₁	Rs ₂	Rs ₃	Rs ₄
Chiralbiotic TAG [®]	Metanol:acetonitrila (50:50, v/v) + 0,1% DEA	0,5	40	-	1,1	0,6	1,3
Chiralbiotic V [®]	Etanol:metanol (70:30, v/v) + 0,025% DEA + 0,2% AA	0,5	28	1,2	0,4	0,9	0,9

t_R: tempo de retenção do último pico a eluir; **Rs₁**: resolução dos enantiômeros N-VEN, **Rs₂**: resolução dos enantiômeros O-VEN, **Rs₃**: resolução dos enantiômeros VEN, **Rs₄**: resolução dos enantiômeros NO-VEN; **V**: vazão da fase móvel.

Tabela 14. Comparação dos resultados obtidos com as colunas quirais baseadas em derivados de polissacarídeos.

Coluna	Fase móvel	V (mL min ⁻¹)	t _R (min)	Rs ₁	Rs ₂	Rs ₃	Rs ₄
Chiralpak AD [®]	Hexano:2-propanol (95:5, v/v) + 0,025% DEA	1,0	19	1,5	2,5	1,3	-
Chiralpak AD-H [®]	Metanol:etanol (70:30, v/v) + 0,025% DEA	0,5	11	2,3	3,0	2,4	0,6
Chiralcel OG [®]	Hexano:etanol: 2- propanol (95:3:2, v/v/v) + 0,1% DEA + 0,1% AA	0,8	33	0,7	0,2	-	0,6

t_R: tempo de retenção do último pico a eluir; **Rs₁**: resolução dos enantiômeros N-VEN, **Rs₂**: resolução dos enantiômeros O-VEN, **Rs₃**: resolução dos enantiômeros VEN, **Rs₄**: resolução dos enantiômeros NO-VEN; **V**: vazão da fase móvel.

A análise dos parâmetros avaliados demonstrou que as colunas Chiralpak AD-H[®] e Chiralpak AD[®] foram eficientes na separação dos enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN em tempos de retenção relativamente baixos. Já a coluna Chirobiotic TAG[®] proporcionou a melhor separação dos enantiômeros da NO-VEN, porém não foi possível obter a separação dos enantiômeros da N-VEN nesta coluna.

Entre todas as colunas avaliadas, a que mostrou melhores resultados foi a Chiralpak AD-H[®], possibilitando a separação de todos os pares de enantiômeros em apenas 11 minutos. Resoluções maiores que 2,0 foram obtidas para todos os pares de enantiômeros, exceto para o par NO-VEN. Entretanto, essa coluna não foi adequada para a separação entre fármaco e metabólitos. A coleção de alguns

picos impossibilita o emprego da detecção por UV-Vis, mas não impede que essa coluna seja usada com detecção por MS já que fármacos e metabólitos possuem diferentes valores de razão massa/carga. O uso desse detector mais seletivo e sensível é ideal para aplicações que envolvem a análise de concentrações reduzidas como é o caso de estudos de disposição cinética. Portanto, essa coluna foi selecionada para o desenvolvimento do método de análise da VEN e seus metabólitos em plasma com aplicação em estudos de disposição cinética.

A coluna Chiralpak AD[®] empregada no modo normal de eluição demonstrou boa resolução dos enantiômeros da VEN, O-VEN e N-VEN em diferentes tempos de retenção, possibilitando o emprego da detecção por UV-Vis. Sendo assim, esta coluna foi selecionada para o estudo de biotransformação *in vitro* da VEN, pois usualmente neste estudo os metabólitos aparecem em concentrações mais elevadas quando comparadas com as concentrações obtidas em estudo *in vivo*, permitindo o emprego de métodos de detecção menos sensíveis. O metabólito NO-VEN está presente em concentrações muito baixas e a não quantificação desse metabólito não trará prejuízos aos estudos de biotransformação *in vitro*.

Até o momento não existe nenhum método descrito na literatura que empregue coluna quiral baseada em derivados de polissacarídeos para a resolução dos enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN. Wen; Feng; Huan-de (2007) conseguiram separar os enantiômeros da VEN e O-VEN na coluna Chirobiotic V[®] usando condição de fase reversa com a fase móvel constituída por Acetato de amônio 30 mmol L⁻¹:metanol (15:85, v/v). Mais recentemente, Kingbäck et al. (2010) obtiveram a resolução de VEN, O-VEN, N-VEN e NO-VEN nessa mesma coluna empregando a fase móvel composta por tetrahidrofurano:acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ pH 6,0 (10:90, v/v).

4.1.4 Ordem de eluição dos enantiômeros VEN e seus metabólitos (N-VEN e O-VEN)

Os enantiômeros puros da VEN, N-VEN e O-VEN (obtidos por análise semipreparativa nas condições estabelecidas empregando as colunas Chiralpak AD[®] e Chiralpak AD-H[®]) foram analisados empregando a coluna Chirobiotic V (250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm) e metanol:acetato de amônio 30 mmol L⁻¹ pH 6,0 (85:15, v/v) como fase móvel, na vazão de 1,0 mL min⁻¹, conforme proposto por Wen et al.

(2007). No método empregando a coluna Chiralpak AD[®] e hexano:2-propanol (95:5, v/v) + 0,025% de DEA como fase móvel, ficou estabelecido que o primeiro pico corresponde ao enantiômero (-)-(R) e o segundo ao enantiômero (+)-(S) para VEN, N-VEN e O-VEN. Para o método empregando a coluna Chiralpak AD-H[®] e metanol:etanol (70:30, v/v) + 0,025% de DEA como fase móvel, a ordem de eluição dos enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN foi invertida sendo o primeiro pico correspondente ao enantiômero (+)-(S) e o segundo pico ao enantiômero (-)-(R) de todos os analitos.

4.2 Análise enantiosseletiva de venlafaxina e seus metabólitos em microsomas de fígado de ratos empregando HF-LPME/LC-UVis

4.2.1 Otimização das condições de extração por HF-LPME para determinação da VEN e seus metabólitos no meio de incubação

A VEN e seus metabólitos são compostos que apresentam caráter básico ($pK_a \sim 9,5$) e, por este motivo, o procedimento de extração foi desenvolvido utilizando um sistema de três fases. Na HF-LPME de três fases, os analitos básicos são extraídos de uma solução alcalina (fase doadora) para uma solução ácida (fase aceptora) localizada no lúmen de uma membrana hidrofóbica, através de um solvente orgânico (fase orgânica) imobilizado nos poros desta membrana. Os solventes orgânicos empregados para esta finalidade devem ser imiscíveis em água, não voláteis e serem facilmente impregnados nos poros da membrana. A solubilidade dos analitos no solvente orgânico deve ser maior do que na fase doadora, porém menor do que na fase aceptora (RASMUSSEN; BJERGAARD-PEDERSEN, 2004; ZHAO; ZHU; LEE, 2002).

Durante a otimização do procedimento de extração, a fase doadora (4 mL) era composta pelos padrões de VEN, N-VEN e O-VEN ($\sim 12,5 \mu\text{g}$ de cada enantiômero por mL de meio de incubação), 50 μL de fração microsomal de fígado de ratos (2 mg de proteínas mL^{-1}), 950 μL de tampão fosfato 1 mol L^{-1} (pH 7,4), 0,4 mL de ácido perclórico 6% (v/v), 0,3 mL de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} e 2,3 mL de água. A adição de ácido perclórico 6% tem por finalidade encerrar o processo de biotransformação, o que deixa a amostra ácida (pH 2,0). Considerando o caráter básico dos compostos e a necessidade de mantê-los na forma não protonada para

possibilitar a extração, o pH foi aumentado para 10 empregando hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} .

Inicialmente foram avaliados o solvente orgânico e a fase aceptora. Para este estudo foram selecionados os três solventes orgânicos mais comumente empregados em HF-LPME (1-octanol, éter n-hexílico e acetato de dodecila) e três fases aceptoras (ácido trifluoroacético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido perclórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Foi delineado um planejamento experimental de 3^2 experimentos (Tabela 4) para avaliar todas as interações possíveis entre estes dois fatores nos três níveis estudados. Todos os solventes foram impregnados por 10 segundos e, em seguida, o excesso foi removido em ultrassom por 10 segundos. O volume das fases aceptoras em todos os experimentos foi de $50 \text{ }\mu\text{L}$.

A Figura 9 mostra as recuperações obtidas nos experimentos empregando ácido trifluoroacético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como fase aceptora. Não houve extração dos analitos em nenhuma das condições avaliadas utilizando o ácido perclórico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como fase aceptora. Uma possível explicação para isso é que o ânion perclorato pode estar formando um par iônico com os fármacos protonados na fase aceptora, que passam a ter afinidade pelo solvente orgânico presente no lúmen da membrana.

Figura 9. Avaliação de diferentes solventes orgânicos na extração da VEN e seus metabólitos por HF-LPME empregando ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (A) e ácido trifluoroacético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (B) como fases aceptoras.

A melhor recuperação da VEN foi conseguida empregando-se ácido acético 0,1 mol L⁻¹ como fase aceptora e éter n-hexílico como solvente orgânico, enquanto que para os metabólitos, melhores recuperações foram observadas com ácido acético 0,1 mol L⁻¹ /1-octanol. Estas diferentes afinidades do fármaco e metabólitos pelos solventes orgânicos podem ocorrer devido a diferenças de polaridade que existem entre estes compostos. Os metabólitos, por serem mais polares, se solubilizam melhor em um solvente mais polar. Como no estudo de biotransformação *in vitro* é importante a quantificação dos metabólitos, a condição que favoreceu a extração da N-VEN e O-VEN foi selecionada para os estudos subseqüentes, ou seja, o emprego de fase aceptora composta de ácido acético 0,1 mol L⁻¹ e 1-octanol como solvente orgânico.

Estabelecidos o solvente orgânico e a fase aceptora partiu-se para a avaliação dos demais fatores que podem influenciar na HF-LPME: tempo de extração, agitação, concentração do ácido na fase aceptora e pH da fase doadora. Em função desse elevado número de variáveis que podem interferir na extração, foi realizado um planejamento fatorial fracionado para minimizar o número de experimentos. Um planejamento adequado permite, além do aprimoramento do processo, a redução da variabilidade de resultados, redução do tempo de análise e dos custos envolvidos (FERREIRA et al., 2007; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006).

Para a interpretação dos resultados plotados no Minitab é necessário considerar que quanto maior a inclinação da reta maior é a influência do respectivo parâmetro no processo extrativo. Foram observados comportamentos semelhantes entre os analitos para todos os parâmetros avaliados, ou seja, as retas estão inclinadas na mesma direção, havendo apenas diferenças nas inclinações (Figura 10).

A eficiência da extração depende da transferência de massa do analito da fase doadora para a fase orgânica e desta para a fase aceptora, conseqüentemente, é necessário um tempo adequado para que se estabeleça este equilíbrio (ANDERSEN et al., 2002). Neste estudo não foram observadas diferenças significativas na recuperação dos analitos entre 20 min e 40 min, demonstrando que em 20 min já havia se estabelecido o equilíbrio de extração, não havendo maiores recuperações em tempos mais longos. O ajuste do pH da fase doadora é importante para que os analitos fiquem na sua forma molecular, sendo mais facilmente extraídos pelo solvente orgânico imobilizado nos poros da membrana. Neste estudo,

com o pH da fase doadora ajustado em 10 houve extração de maior quantidade dos analitos quando comparado com o pH da fase doadora ajustado em 12. Isto pode ter ocorrido devido a problemas de estabilidade dos analitos em pH mais elevados.

Cabe lembrar que as áreas dos dois enantiômeros de cada composto foram somadas, visando reduzir a quantidade de cálculos a serem realizados. Isto é possível porque o processo de extração não é enantiosseletivo e foram empregadas soluções do racemato para a realização dos testes.

Os fatores que demonstraram ter maior influência na extração dos analitos foram a concentração de ácido na fase aceptora e a agitação do sistema, por este motivo estes fatores foram novamente avaliados em quatro experimentos (Tabela 7). Estes experimentos foram realizados empregando-se fase doadora com pH ajustado em 10 e 20 min de extração.

A Figura 11 mostra as recuperações da VEN e de seus metabólitos nos experimentos realizados para avaliar a influência da força do ácido na fase aceptora e da agitação do sistema. As maiores recuperações foram observadas nos experimentos empregando ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (experimentos 1 e 2), indicando que esta concentração do ácido promove ionização suficiente dos analitos na fase aceptora. Considerando que a quantificação dos metabólitos é prioritária no estudo de biotransformação *in vitro*, as condições empregadas no experimento 1 (ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 1750 rpm) são as mais adequadas, ficando estabelecidas as seguintes condições de extração:

- Tempo: 20 min
- Solvente orgânico: 1-octanol
- Agitação: 1750 rpm
- Comprimento da membrana: 15 cm
- Volume da fase doadora: 4 mL
- pH da fase doadora: pH 10,0
- Fase aceptora: ácido acético: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

Figura 10. Plotagem do Minitab dos valores das áreas da VEN (A), O-VEN (B) e N-VEN (C) nos experimentos do planejamento fatorial fracionado com microsomas de ratos.

Figura 11. Avaliação do efeito da concentração de ácido na fase aceptora e da agitação do sistema na extração da VEN e seus metabólitos por HF-LPME. Experimento 1: ácido acético 0,1 mol L⁻¹ e 1750 rpm; experimento 2: ácido acético 0,1 mol L⁻¹ e 1000 rpm; experimento 3: ácido acético 0,5 mol L⁻¹ e 1750 rpm; experimento 4: ácido acético 0,5 mol L⁻¹ e 1000 rpm.

Após o procedimento de extração, a fase aceptora foi coletada, evaporada a secura sob fluxo de ar comprimido, o resíduo foi dissolvido em 80 µL de fase móvel e 50 µL foram injetados no cromatógrafo. O cromatograma da Figura 12A mostra que o procedimento de extração empregado foi altamente eficiente na eliminação dos interferentes presentes na fração microssomal de fígado de ratos.

4.2.2 Validação

A validação de métodos deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003). O objetivo principal da validação de um método analítico é estabelecer se ele é adequado ao propósito a que se destina (FDA, 2001). Agências nacionais como a ANVISA e internacionais como *Food and Drug Administration* (FDA) e *International Conference of Harmonization* (ICH) são alguns dos órgãos que estabelecem parâmetros os quais devem ser seguidos para validação de métodos bioanalíticos. Os parâmetros que devem ser avaliados são: seletividade, linearidade, recuperação, exatidão, precisão, limite de quantificação, estabilidade e robustez. A seletividade do método foi avaliada apenas através da

observação de interferentes nos cromatogramas referentes a amostras branco. Além disso, a validação do método se restringiu aos metabólitos N-VEN e O-VEN, já que o interesse nos estudos de biotransformação é avaliar a formação desses metabólitos.

Figura 12. Cromatogramas das amostras submetidas à extração. **A** corresponde ao branco do meio de incubação e **B** meio de incubação contendo VEN, N-VEN e O-VEN. Os picos 1 e 2 correspondem a (-)-(R)-VEN e (+)-(S)-VEN, os picos 3 e 4 a (-)-(R)-N-VEN e (+)-(S)-N-VEN e os picos 5 e 6 a (-)-(R)-O-VEN e (+)-(S)-O-VEN. Condições cromatográficas: coluna ChiralpaK AD[®], fase móvel constituída por hexano: 2-propanol (95:5, v/v) + 0,025% de DEA na vazão de 1,0 mL min⁻¹, detecção em 230 nm.

4.2.2.1 Seletividade

A seletividade do método é a capacidade que ele tem de avaliar de maneira inequívoca os analitos em exame na presença de compostos que podem interferir na sua determinação em uma matriz complexa (ANVISA, 2003). Este parâmetro pode ser avaliado através da comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com a substância padrão ou através do emprego da espectrometria de massa.

Neste método a seletividade foi avaliada através da comparação da amostra do branco (Figura 12A) com a amostra do meio de incubação contendo a VEN, N-VEN e O-VEN (Figura 12B).

4.2.2.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004). Este parâmetro pode ser avaliado matematicamente determinando-se o coeficiente de correlação (r^2) de uma curva analítica.

Foram construídas curvas analíticas relacionando as concentrações dos enantiômeros da N-VEN e O-VEN no meio de incubação (x) *versus* as áreas dos picos (y). A ANVISA (2003) define como valores aceitáveis de linearidade coeficientes de correlação superiores a 0,98. Na avaliação da linearidade estabeleceu-se também que os desvios dos valores nominais não poderiam ser superiores a 15%. As Figuras 13 e 14 apresentam as curvas analíticas para os enantiômeros da N-VEN e O-VEN, respectivamente.

Figura 13. Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da N-VEN (intervalo de concentração de 200 a 5000 ng mL⁻¹ para cada enantiômero).

Figura 14. Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da O-VEN (intervalo de concentração de 200 a 5000 ng mL⁻¹ para cada enantiômero).

4.2.2.3 Recuperação

A recuperação avalia a capacidade do processo de preparação da amostra em extrair o analito da matriz. Nem sempre é possível alcançar valores altos de

recuperação e, em alguns casos, ela é sacrificada com o objetivo de melhorar a seletividade do método (CAUSON, 1997). Recuperações menores que 50% têm sido aceitas desde que apresentem precisão adequadas (coeficientes de variação inferiores a 15%).

A porcentagem de recuperação é calculada através da comparação das áreas obtidas para amostras extraídas, fortificadas com concentrações baixa, média e alta dos analitos, com aquelas obtidas para padrões não submetidos ao procedimento de extração. Como pode ser observado na Tabela 15, os valores de recuperação dos enantiômeros da N-VEN e O-VEN de amostras de meio de incubação foram de 38% e 41%, respectivamente, com coeficientes de variação inferiores a 13,3%.

Tabela 15. Porcentagem de recuperação dos enantiômeros da N-VEN e O-VEN em função das diferentes concentrações no meio de incubação.

Concentração (ng mL⁻¹)	500	1500	3000	Média
(-)-(R)-N-VEN				
Recuperação (%)	35,6	41,4	47,3	41,4
CV (%)	13,3	2,4	11,1	8,9
(+)-(S)-N-VEN				
Recuperação (%)	35,1	40,8	48,3	41,4
CV (%)	13,0	2,7	12,3	9,3
(-)-(R)-O-VEN				
Recuperação (%)	33,7	36,8	41,0	37,2
CV (%)	3,8	4,6	5,2	4,5
(+)-(S)-O-VEN				
Recuperação (%)	33,9	38,2	41,6	37,9
CV (%)	4,6	5,2	5,7	5,2

4.2.2.4 Precisão e exatidão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é expressa matematicamente através da estimativa do desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação).

A exatidão demonstra o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor aceito como referência. A exatidão foi avaliada pela análise dos mesmos dados utilizados nos cálculos da precisão intra e interensaios. Os resultados foram expressos em porcentagem do erro relativo, que para esse tipo de estudo deve ser de até 15%.

Os valores de precisão e exatidão intra e interensaios para a N-VEN e O-VEN estão mostrados nas Tabelas 16 e 17, respectivamente. Todos os valores de CV e erro foram inferiores a 15% (ANVISA, 2003).

Tabela 16. Precisão e exatidão intra e interensaios do método de análise dos enantiômeros da N-VEN.

	Intra-ensaio (n=5)			Interensaios (n=3)		
	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)
500 (ng mL⁻¹)						
(-)-(R)-N-VEN	475,2	12,3	-4,9	439,6	14,4	-12,0
(+)-(S)-N-VEN	510,2	11,8	2,0	481,0	14,6	-3,8
1500 (ng mL⁻¹)						
(-)-(R)-N-VEN	1404,6	9,9	-6,4	1375,3	12,1	-8,3
(+)-(S)-N-VEN	1446,1	8,8	-3,6	1434,0	11,8	-4,4
3000 (ng mL⁻¹)						
(-)-(R)-N-VEN	2723,9	8,3	-9,2	2687,7	12,8	-10,4
(+)-(S)-N-VEN	2879,1	7,6	-4,0	2865,8	14,7	-4,5

Tabela 17. Precisão e exatidão intra e interensaios do método de análise dos enantiômeros da O-VEN.

	Intra-ensaio (n=5)			Interensaios (n=3)		
	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)
500 (ng mL⁻¹)						
(-)-(R)-O-VEN	517,7	10,0	3,5	446,9	13,9	-10,6
(+)-(S)-O-VEN	528,7	6,2	5,7	466,1	13,6	-6,8
1500 (ng mL⁻¹)						
(-)-(R)-O-VEN	1587,3	10,3	5,8	1465,7	14,6	-2,3
(+)-(S)-O-VEN	1637,3	9,1	9,2	1524,2	13,8	1,6
3000 (ng mL⁻¹)						
(-)-(R)-O-VEN	2643,7	10,4	-11,9	2669,3	8,75	-11,0
(+)-(S)-O-VEN	2751,3	9,6	-8,3	2710,7	10,4	-9,6

4.2.2.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, ou seja, com CV e erro relativo inferiores a 20% (SHAH et al., 1992). Este parâmetro foi avaliado na concentração de 200 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da N-VEN e O-VEN (Tabela 18).

Tabela 18. Precisão e exatidão referentes à avaliação dos limites de quantificação dos enantiômeros da N-VEN e O-VEN.

Enantiômeros	Conc. Teórica	Conc. Obtida	Precisão	Exatidão
	ng mL ⁻¹	ng mL ⁻¹	CV (%)	E (%)
(-)-(R)-N-VEN	200	221	14,3	10,6
(+)-(S)-N-VEN	200	191	17,7	-4,3
(-)-(R)-O-VEN	200	171	5,4	-14,8
(+)-(S)-O-VEN	200	183	8,5	-8,4

4.2.2.6 Estabilidade

A estabilidade dos enantiômeros da N-VEN e O-VEN foi avaliada através de ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade no tempo de análise e estabilidade na condição de incubação. Foram comparadas as áreas dos enantiômeros obtidas nos ensaios de estabilidade com as áreas obtidas a partir da análise de amostras frescas, sendo calculados os respectivos erros relativos (E) (Tabela 19). Os valores de erro observados em todos os estudos de estabilidade não foram superiores a 15%. Além disso, nas condições avaliadas não foi observada a formação de produtos de degradação.

Tabela 19. Estudo da estabilidade dos metabólitos da VEN no tempo de análise, ciclos de congelamento-descongelamento e condição de incubação.

Analito	E (%)					
	Tempo de análise		Ciclos congelamento-descongelamento		Condição de incubação	
			Baixa ^a	Alta ^b	Baixa ^a	Alta ^b
(-)-(R)-N-VEN	-0,5	-1,3	-6,4	-6,5	-2,5	2,3
(+)-(S)-N-VEN	-5,3	-3,8	-9,9	-6,8	0,6	2,4
(-)-(R)-O-VEN	-6,2	-3,5	2,5	6,9	-5,1	-5,4
(+)-(S)-O-VEN	-0,3	-3,1	-4,5	-5,8	-2,4	-4,1

^a Concentração baixa analisada: 500 ng mL⁻¹, ^b Concentração alta analisada: 3000 ng mL⁻¹

4.2.2.7 Robustez

De acordo com o INMETRO, a robustez de um método (*robustness*) mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em HPLC, programação da temperatura e natureza do gás de arraste em GC, tempo de extração e agitação, na etapa de preparação das amostras, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI et al., 2004).

No estudo da robustez foi avaliada a interferência de pequenas modificações na composição da fase móvel, vazão da fase móvel e temperatura da sala na resolução (R_s) e fator de separação (α) dos picos.

Tabela 20. Valores de resolução (R_s) e fator de separação (α) na avaliação da robustez do método.

Condições avaliadas	N-VEN		O-VEN	
	R_s	α	R_s	α
Condições normais*	1,5	1,1	2,5	1,4
Vazão 0,9 mL min ⁻¹	1,3	1,1	2,5	1,4
Vazão 1,1 mL min ⁻¹	1,2	1,1	2,5	1,3
Fase móvel Hexano:2-propanol (96:4, v/v) + 0,025% DEA	1,7	1,1	3,8	1,3
Fase móvel Hexano:2-propanol (94:6, v/v) + 0,025% DEA	1,3	1,1	2,6	1,4
Temperatura 25 °C	1,4	1,1	2,6	1,4

*Fase móvel: hexano:2-propanol (95:5, v/v) + 0,025% DEA, temperatura da sala 22°C, vazão da fase móvel 1,0 mL min⁻¹

O estudo de robustez demonstrou que pequenas variações (3°C) na temperatura da sala e vazão da fase móvel (0,9 mL min⁻¹ ou 1,1 mL min⁻¹) não afetam significativamente a R_s e o α dos analitos (Tabela 20). O emprego de fase móvel composta de hexano:2-propanol (96:4 v/v) + 0,025% de DEA proporcionou maiores resoluções entre os picos. No emprego do modo normal de eluição, maiores concentrações de hexano na fase móvel retardam a eluição de compostos polares devido ao aumento da interação destes compostos com a fase estacionária, aumentando, conseqüentemente, a R_s e o tempo de análise.

4.2.3. Aplicação do método HF-LPME/LC-UV/vis em um estudo de biotransformação empregando microsomas de fígado de ratos

A biotransformação de um fármaco é um fator determinante na sua atividade terapêutica e nos possíveis efeitos tóxicos decorrentes de sua administração. Dentre os diversos sistemas enzimáticos responsáveis pelo processo de biotransformação, destaca-se o citocromo P450 (CYP450) (KALRA, 2007). As enzimas do CYP450 são pertencentes a uma superfamília de heme-proteínas amplamente distribuídas em todos os seres vivos e estão envolvidas na biotransformação de uma variedade de compostos quimicamente diferentes (SILVA et al., 2002). Os enantiômeros de um fármaco quiral podem se comportar de maneira distinta quando em contato com

estes sistemas enzimáticos; os enantiômeros podem ser biotransformados por diferentes enzimas do CYP450 ou podem apresentar diferentes afinidades pela mesma enzima (BRANDON et al., 2003).

Para avaliar a biotransformação de um fármaco pode-se empregar modelos *in vitro* ou *in vivo*. Nos estudos *in vitro* são empregadas sub-frações celulares hepáticas (microsomal, citosólica e fração S9), hepatócitos, fatias de fígado e enzimas recombinantes do CYP450 (TINGLE; HELSBY, 2006). Os métodos *in vitro* são úteis para ajudar na seleção racional de espécies de animais, para estudos toxicológicos, para a comparação de perfil metabólico, para avaliar a influência de diferentes espécies na biotransformação e para a produção de metabólitos para desenvolvimento de métodos bioanalíticos, etc. Estes estudos são mais fáceis, rápidos e baratos, além de permitirem o emprego de elevada quantidade de fármaco.

Os estudos *in vivo* são mais abrangentes, pois levam em consideração todas as etapas farmacocinéticas, porém as variações interespecies e interindividuais dificultam a transposição dos resultados para humanos (SILVA et al., 2002).

Aproximadamente 80% da dose oral da VEN é eliminada pela urina, sendo 5% na forma inalterada, 56% como O-VEN, 18% como N-VEN e 1% como NO-VEN. Estudos *in vitro* demonstram que a O-desmetilação é mediada primordialmente pela isoforma CYP2D6 e a N-desmetilação pela enzima CYP3A4 (SÁNCHEZ; HYTTEL, 1997; AMCHIN et al., 1999).

Existem alguns trabalhos que demonstram a interação enantiosseletiva da VEN com as enzimas do CYP450, porém estes trabalhos empregaram prioritariamente modelos *in vivo* e avaliam principalmente a formação da O-VEN. Otton e colaboradores (1996) realizaram um estudo de biotransformação *in vitro* empregando a fração microsomal de fígado humano e observaram um resultado oposto ao verificado nos estudos *in vivo* com formação em maior proporção do enantiômero (S)-O-VEN. Não existem estudos disponíveis na literatura empregando modelos *in vitro* para a avaliação da formação dos enantiômeros dos demais metabólitos da VEN.

O método aqui desenvolvido foi aplicado em um estudo de biotransformação *in vitro* utilizando a fração microsomal de fígados de ratos Wistar (Figura 15). As amostras de fração microsomal foram diariamente retiradas do freezer e submetidas ao processo de incubação e posterior extração e análise. Para a

quantificação dos enantiômeros da N-VEN e O-VEN eram construídas, diariamente, curvas analíticas de amostras contendo soluções-padrão da N-VEN e O-VEN nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio de linearidade (item 4.2.2.2).

Figura 15. Cromatograma das amostras submetidas à extração após incubação. Os picos 1 e 2 correspondem a (-)-(R)-VEN e (+)-(S)-VEN, os picos 3 e 4 a (-)-(R)-N-VEN e (+)-(S)-N-VEN e os picos 5 e 6 a (-)-(R)-O-VEN e (+)-(S)-O-VEN. Condições cromatográficas: coluna ChiralpaK AD®, fase móvel constituída por hexano: 2-propanol (95:5, v/v) + 0,025% de DEA, na vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em 230 nm. Condição de incubação: Concentração de proteínas no meio de incubação: 4,0 mg mL⁻¹, tempo: 30 min.

4.2.3.1. Otimização das condições de incubação

Os parâmetros em que o fármaco é incubado interferem quali e quantitativamente na formação dos metabólitos. A concentração de proteínas e tempo de incubação são fatores que devem ser otimizados para a realização de estudos de biotransformação com fração microssomal (RILEY; GRIME, 2004). Desta forma, o objetivo desta etapa foi determinar as condições de incubação em que a formação dos metabólitos fosse linear de tal forma a possibilitar o cálculo dos parâmetros cinéticos da biotransformação.

4.2.3.1.1 Concentração de proteínas da fração microssomal no meio de incubação

Foram realizadas incubações (em triplicata) com as concentrações de proteínas no meio de incubação de 1,0, 2,0, 4,0 e 6,0 mg mL⁻¹. Partiu-se de uma

fração microsomal (estoque) com concentração de proteínas de $31,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Nestes ensaios foram empregadas alíquotas de $25 \text{ }\mu\text{L}$ da solução da VEN na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (correspondente a $12,5 \text{ }\mu\text{g}$ de cada enantiômero da VEN por mL de meio de incubação) e o tempo de incubação foi de 30 min. As Figuras 16 e 17 ilustram a relação entre a concentração dos enantiômeros da N-VEN e O-VEN nas diferentes concentrações de proteínas no meio de incubação

Figura 16. Variação da concentração dos enantiômeros da N-VEN em função da concentração de proteínas no meio de incubação.

Figura 17. Variação da concentração dos enantiômeros da O-VEN em função da concentração de proteínas no meio de incubação.

Verificou-se que a biotransformação da VEN foi enantiosseletiva, havendo formação de maiores concentrações da $(-)-(R)\text{-N-VEN}$ e $(-)-(R)\text{-O-VEN}$. Na faixa de concentração de proteína ($1,0 - 6,0 \text{ mg mL}^{-1}$) avaliada, verificou-se resposta linear, ou seja, a formação dos metabólitos é diretamente proporcional à concentração de proteínas no meio de incubação. A concentração de $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$ passou a ser

empregada como concentração de proteína no meio de incubação para os novos experimentos. Para se obter esta concentração é necessário o emprego de 32 μL da solução estoque de fração microsomal.

4.2.3.1.2 Tempo de incubação

Foram realizadas incubações (em triplicata) nos tempos de 5, 15, 30 e 60 minutos. Nestes ensaios foram empregadas alíquotas de 25 μL da solução-padrão da VEN na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (correspondente a 12,5 μg de cada enantiômero da VEN por mL de meio de incubação) e a concentração de proteínas no meio de incubação foi de $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

As incubações realizadas por períodos mais longos proporcionaram maiores concentrações dos metabólitos. A formação do metabólito N-VEN foi linear até 30 min (Figura 18B), após este período de incubação, ocorre a saturação das enzimas que é caracterizada pela produção constante do produto de biotransformação (Figura 18A). Em relação à formação da O-VEN, verificou-se resposta linear no intervalo de tempo avaliado (Figura 19). Houve biotransformação enantiosseletiva da VEN, havendo formação prioritária da (-)-(R)-N-VEN e (-)-(R)-O-VEN. A enantiosseletividade é mais pronunciada na formação da N-VEN com diferenças mais significativas entre as concentrações dos enantiômeros.

Figura 18. Variação da concentração dos enantiômeros da N-VEN em função do tempo de incubação; **A:** 0 – 60 min, **B:** 0 – 30 min.

Figura 19. Variação da concentração dos enantiômeros da O-VEN em função do tempo de incubação.

Baseado nos resultados observados estabeleceu-se 30 minutos como tempo de incubação mais adequado para ser empregado nos próximos experimentos.

4.2.3.1.3. Concentração do substrato

Estabelecidas as condições ideais de incubação (4,0 mg de proteínas por mL de meio de incubação e 30 minutos) avaliou-se a biotransformação frente a variação da concentração da VEN. Foram realizadas incubações (em triplicata) empregando-se a rac-VEN nas seguintes concentrações: 36, 90, 180, 360mM. O metabólito N-VEN foi formado em maior proporção e exibiu enantiosseletividade em todas as concentrações avaliadas enquanto a O-VEN apresenta enantiosseletividade apenas em concentrações de substrato superiores a 180 mM; o enantiômero (-)-(R) de ambos os metabólitos é formado em maiores proporções (Figura 20).

Figura 20. Variação da concentração dos enantiômeros da N-VEN e O-VEN em função da variação da concentração do substrato (VEN).

A biotransformação enantiosseletiva da VEN com a formação prioritária da isoforma (-)-(R)- dos metabólitos O-VEN e N-VEN já havia sido previamente demonstrada em estudos *in vivo* conduzidos em ratos, cachorros e humanos (GEX-FABRY et al., 2002; EAP et al., 2003).

Os estudos *in vitro* permitem avaliar a etapa de biotransformação isoladamente das demais etapas farmacocinéticas, além de permitir a determinação da cinética da biotransformação do fármaco, estabelecendo-se a velocidade de biotransformação e a afinidade do fármaco às diferentes enzimas do CYP 450. Infelizmente, nas condições empregadas neste estudo não foi possível determinar os parâmetros cinéticos da biotransformação da VEN, pois não foi observado um comportamento característico da cinética de Michaelis-Menten (gráfico da variação da concentração do substrato x metabólitos tipo hipérbole), que é a cinética mais comum para a maioria dos xenobióticos. Para se ter informações mais precisas seria necessário ampliar a faixa de estudo da concentração do substrato, porém, em função da limitação da detectabilidade do método não foi possível avaliar concentrações inferiores.. De qualquer forma, o estudo *in vitro* foi útil para mostrar que a VEN é biotransformada enantiosseletivamente com formação prioritária da isoforma (-)-(R)- dos metabólitos O-VEN e N-VEN e que o metabólito N-VEN é produzido em maior quantidade empregando microssomas de ratos.

4.3 Análise enantiosseletiva de venlafaxina e seus metabólitos em plasma empregando HF-LPME/LC-MS-MS

4.3.1 Análise cromatográfica

Conforme já discutido no item 4.1.3, o emprego da coluna Chiralpack AD-H® com fase móvel composta por metanol:etanol (7:3, v/v) acrescida de 0,025% de DEA possibilitou boa resolução ($R_s > 2,0$) dos enantiômeros da VEN, O-VEN e N-VEN, mas baixa resolução dos enantiômeros da NO-VEN ($R_s = 0,6$) (Tabela 14). Sendo assim, a quantificação desse metabólito foi descartada. Na condição cromatográfica empregada, a ordem de eluição dos enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN ficou estabelecida como o primeiro pico correspondente ao (+)-(S) e o segundo ao (-)-(R) enantiômero. A quantificação da VEN e dos seus metabólitos foi feita empregando a padronização interna, com o atenolol selecionado como padrão interno.

Os solventes orgânicos polares são de fácil evaporação e extremamente compatíveis com a detecção por MS quando comparados com as fases móveis normais constituídas por hexano. A presença de DEA na fase móvel, mesmo em concentração baixa (0,025%), foi imprescindível para a resolução e eluição dos analitos da coluna cromatográfica, no entanto, seu emprego pode dificultar a ionização dos compostos básicos quando se emprega a detecção por MS com fonte de eletronebulização no modo positivo. Isso foi observado na análise da VEN e seus metabólitos.

Para contornar a supressão da ionização sem, contudo, interferir na resolução dos picos dos analitos, empregou-se uma infusão pós-coluna de uma solução ácida. Infusões de soluções de ácido acético em diferentes concentrações (0,1 – 0,5%) e diferentes vazões (0,1 – 0,3 mL min⁻¹) foram avaliadas, sendo que o emprego de uma solução com 0,2% de ácido acético na vazão de 0,1 mL min⁻¹ demonstrou ser a mais adequada, minimizando os efeitos da supressão da ionização.

A detecção da VEN e seus metabólitos foi conduzida separadamente pelo monitoramento de cada molécula protonada e seu respectivo produto de fragmentação (MRM) (Figura 21). Desta forma, não houve a preocupação com possíveis co-eluições entre os enantiômeros do fármaco e de seus metabólitos, nem com interferentes endógenos presentes no plasma.

atenolol DAUGHTER SCAN CONE 35 col 27

ATENLOLOL DAUGHTER SCAN ESI+ CONE 35 COL 27 1 (0.027)

Daughters of 266ES+
1.80e7

NO_VENLAFAXINA DAUGHTER SCAN ESI+ CONE 27 COL 12 1 (0.027)

Daughters of 250ES+
1.49e7

N_VENLAFAXINA DAUGHTER SCAN ESI+ CONE 30 COL 17 1 (0.027)

Daughters of 264ES+
2.53e6

O_VENLAFAXINA DAUGHTER SCAN ESI+ CONE 25 COL 15 1 (0.027)

Daughters of 264ES+
7.55e6

VENLAFAXINA DAUGHTER SCAN ESI+ LM7 COL15 1 (0.027)

Daughters of 277ES+
1.56e7

Figura 21. Espectros de massas resultantes da fragmentação após infusão direta dos padrões de Atenolol (A), NO-VEN (B), N-VEN (C), O-VEN (D) e VEN (E).

4.3.2 Otimização das condições de extração por HF-LPME para a determinação da VEN e seus metabólitos em amostras de plasma

Para a otimização da extração da VEN, O-VEN e N-VEN por HF-LPME empregou-se a mesma combinação solvente orgânico – fase aceptora estabelecida para a extração destes compostos do meio de incubação e realizou-se um planejamento fatorial fracionado (Tabela 10) para determinar a interferência dos demais fatores na recuperação dos analitos. A interferência da adição de cloreto de sódio também foi avaliada nesta matriz visando verificar se o efeito “salting out” poderia favorecer a extração dos analitos. A Figura 22 mostra os resultados obtidos.

Cabe ressaltar que, a exemplo do que foi feito na otimização do procedimento de extração para análise dos metabólitos da VEN em fração microssomal de fígado de ratos, as áreas dos picos dos dois enantiômeros de cada composto foram somadas, visando reduzir a quantidade de cálculos a serem realizados.

Figura 22. Plotagem do Minitab dos valores das áreas da VEN (A), O-VEN (B) e N-VEN (C) nos experimentos do planejamento fatorial fracionado com as amostras de plasma.

Assim como já mencionado previamente, para a interpretação dos resultados plotados no Minitab é necessário considerar que quanto maior a inclinação da reta maior é a influência do respectivo parâmetro no processo extrativo. Deste modo, foram observados comportamentos distintos entre os analitos para alguns parâmetros avaliados. O tempo de extração não exerce influência significativa na extração da O-VEN e N-VEN, enquanto que para a VEN, o emprego de maior tempo de extração proporcionou redução na recuperação deste composto. Isto pode ter ocorrido em função da evaporação do solvente orgânico em tempos mais prolongados de extração. A presença de sal na fase doadora influenciou negativamente a extração da VEN e N-VEN, enquanto que para a O-VEN, este parâmetro não foi significativo. A força da fase aceptora demonstrou interferir significativamente somente na extração da VEN e N-VEN, com maiores recuperações empregando a solução de ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A agitação e o pH da amostra demonstraram ser parâmetros importantes na recuperação da VEN, O-VEN e N-VEN, sendo observadas as mesmas tendências para todos os compostos: maiores recuperações com agitações mais vigorosas e com amostras menos alcalinas. O pH da amostra ajustado em 10 foi suficiente para que a VEN e seus metabólitos ficassem nas suas formas moleculares e, o excesso de álcali, pode estar propiciando a degradação destes compostos. A condição estabelecida para a extração da VEN, N-VEN e O-VEN das amostras de plasma foi a mesma empregada na extração da N-VEN e O-VEN das amostras de microssomas de fígado de ratos. Desta forma ficou estabelecida a seguinte condição de extração:

- *Tempo: 20 min*
- *Solvente orgânico: 1-octanol*
- *Agitação: 1750 rpm*
- *Comprimento da membrana: 15 cm*
- *Volume da fase doadora: 4 mL*
- *pH da fase doadora: pH 10,0*
- *Fase aceptora: ácido acético: $0,1 \text{ mol L}^{-1}$*

Após o procedimento de extração a fase aceptora foi coletada, o solvente foi evaporado a secura sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 80 μ L de fase móvel e 50 μ L foram injetados no cromatógrafo (Figura 23).

Figura 23. Cromatogramas de plasma fortificado com os enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN e submetido à extração. **A:** os picos 1 e 2 correspondem a (+)-(S)-VEN e (-)-(R)-VEN. **B** atenolol. **C:** os picos 1 e 2 correspondem a (+)-(S)-N-VEN e (-)-(R)-N-VEN. **D:** os picos 1 e 2 correspondem a (+)-(S)-O-VEN e (-)-(R)-O-VEN. Condições cromatográficas: coluna ChiralpaK AD-H®, fase móvel constituída por metanol: etanol (70:30, v/v) + 0,025% de DEA na vazão de 0,5 mL min⁻¹.

4.3.3 Validação

O método desenvolvido foi validado seguindo os parâmetros estabelecidos pelas agências regulamentadoras, sendo que, em função da baixa detectabilidade do método para a NO-VEN, este analito não foi submetido ao processo de validação.

4.3.3.1 Linearidade

Foram construídas curvas analíticas relacionando as concentrações dos enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN no plasma (x) *versus* as razões das áreas dos picos analito/padrão interno (y). O atenolol foi empregado como padrão interno nas determinações. Coeficientes de correlação superiores a 0,98 e desvios dos valores nominais inferiores a 15% foram considerados aceitáveis. As Figuras 24-26 apresentam as curvas analíticas para os enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN, respectivamente.

Figura 24. Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da VEN (intervalo de concentração de 5 a 500 ng mL⁻¹ para cada enantiômero).

Figura 25. Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da N-VEN (intervalo de concentração de 5 a 500 ng mL⁻¹ para cada enantiômero).

Figura 26. Curvas analíticas demonstrando a linearidade do método de análise dos enantiômeros da O-VEN (intervalo de concentração de 5 a 500 ng mL⁻¹ para cada enantiômero).

4.3.3.2 Recuperação

Foram obtidas baixas percentagens de recuperações, especialmente para os enantiômeros da N-VEN e O-VEN, porém todos os coeficientes de correlação foram

inferiores a 14,3% (Tabela 21). Embora o método de extração tenha sido idêntico ao utilizado para a matriz fração microsomal de fígado de ratos, as diferenças observadas nas recuperações podem estar relacionadas com as diferenças de viscosidades dos dois meios.

Tabela 21. Porcentagem de recuperação dos enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN em função das diferentes concentrações no plasma.

Concentração (ng mL⁻¹)	12,5	250	375	Média
(+)-(S)-VEN				
Recuperação (%)	59,3	53,5	49,0	54,1
CV (%)	5,2	5,8	4,9	5,3
(-)-(R)-VEN				
Recuperação (%)	51,7	61,6	48,9	54,1
CV (%)	14,3	9,7	5,6	9,9
(+)-(S)-N-VEN				
Recuperação (%)	28,0	37,5	33,1	32,9
CV (%)	11,0	6,0	11,1	9,4
(-)-(R)-N-VEN				
Recuperação (%)	25,4	28,7	26,6	26,9
CV (%)	13,4	6,0	8,7	9,4
(+)-(S)-O-VEN				
Recuperação (%)	13,6	14,2	12,2	13,3
CV (%)	5,4	8,8	13,0	9,1
(-)-(R)-O-VEN				
Recuperação (%)	16,7	13,7	11,8	14,1
CV (%)	4,6	3,0	7,7	5,1

4.3.3.3 Precisão e exatidão

A exatidão foi avaliada pela análise dos mesmos dados utilizados nos cálculos da precisão intra e interensaios. Os resultados foram expressos em porcentagem do erro relativo e todos os valores foram inferiores a 15%.

Os valores de precisão e exatidão intra e interensaios para a VEN, N-VEN e O-VEN estão demonstrados nas Tabelas 22-24, respectivamente. Todos os CV foram inferiores a 15%.

Tabela 22. Precisão e exatidão intra e interensaios para análise dos enantiômeros da VEN.

	Intra-ensaio (n=5)			Interensaios (n=3)		
	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)
12,5 (ng mL⁻¹)						
(+)-(S)-VEN	13,6	13,7	8,8	12,1	8,8	-3,2
(-)-(R)-VEN	13,6	7,7	8,8	12,4	10,7	-0,8
250 (ng mL⁻¹)						
(+)-(S)-VEN	242,5	5,5	-3,0	239,7	5,1	-4,1
(-)-(R)-VEN	243,5	5,3	-2,6	255,1	7,9	2,0
375 (ng mL⁻¹)						
(+)-(S)-VEN	344,8	13,6	-8,0	368,0	8,9	-1,9
(-)-(R)-VEN	332,4	12,3	-11,3	357,2	11,3	-4,7

Tabela 23. Precisão e exatidão intra e interensaios para análise dos enantiômeros da N-VEN.

	Intra-ensaio (n=5)			Interensaios (n=3)		
	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)
12,5 (ng mL⁻¹)						
(+)-(S)-N-VEN	12,9	12,3	3,2	13,2	7,7	5,6
(-)-(R)-N-VEN	13,1	10,,8	4,8	11,8	9,0	-5,6
250 (ng mL⁻¹)						
(+)-(S)-N-VEN	238,8	8,9	-4,5	266,9	13,8	6,8
(-)-(R)-N-VEN	257,9	5,7	3,2	244,0	9,7	-2,4
375 (ng mL⁻¹)						
(+)-(S)-N-VEN	380,0	7,9	1,3	396,5	8,9	5,7
(-)-(R)-N-VEN	377,4	13,9	0,6	352,0	12,1	-6,1

Tabela 24. Precisão e exatidão intra e interensaios para análise dos enantiômeros da O-VEN.

	Intra-ensaio (n=5)			Interensaios (n=3)		
	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)	E (%)
12,5 (ng mL⁻¹)						
(+)-(S)-O-VEN	11,4	5,8	-8,8	11,0	5,5	-12,0
(-)-(R)-O-VEN	14,1	8,6	12,8	13,9	8,1	11,2
250 (ng mL⁻¹)						
(+)-(S)-O-VEN	234,8	9,3	-6,0	238,0	10,8	-4,8
(-)-(R)-O-VEN	232,0	8,8	-7,2	229,9	11,5	-8,0
375 (ng mL⁻¹)						
(+)-(S)-O-VEN	419,7	13,2	11,9	399,8	12,0	6,6
(-)-(R)-O-VEN	398,6	12,4	6,3	379,2	12,7	1,1

4.3.3.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação para os enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN foi de 5 ng mL⁻¹ com CV inferiores a 20% (Tabela 25). Apesar da baixa recuperação observada (Tabela 21), os limites de quantificação obtidos foram comparados àqueles reportados na literatura (0,5 – 25 ng mL⁻¹) (KINGBÄCK et al., 2010; WEN; FENG; HUAN-DE, 2007; RUDAZ et al., 2000).

Tabela 25. Precisão e exatidão referentes à avaliação dos limites de quantificação para os enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN.

Enantiômeros	Conc. Teórica ng mL ⁻¹	Conc. Obtida ng mL ⁻¹	Precisão CV (%)	Exatidão E (%)
(+)-(S)-VEN	5,0	5,4	10,8	9,3
(-)-(R)-VEN	5,0	5,4	14,1	8,0
(+)-(S)-N-VEN	5,0	5,5	13,3	10,7
(-)-(R)-N-VEN	5,0	4,9	8,1	-2,0
(+)-(S)-O-VEN	5,0	5,5	10,2	10,3
(-)-(R)-O-VEN	5,0	5,6	14,5	12,2

4.3.3.5 Estabilidade

Foi avaliada a estabilidade dos enantiômeros da VEN, N-VEN e O-VEN através de ciclos de congelamento e descongelamento e estabilidade no tempo de análise. Foram comparadas as áreas dos enantiômeros obtidas nos ensaios de estabilidade com as áreas obtidas a partir da análise de amostras frescas, sendo calculados os respectivos erros relativos (E) (Tabela 26). Em todos os estudos de estabilidade não foram verificados E maiores que 15% e nas condições avaliadas não foi observada a formação de produtos de degradação.

Tabela 26. Estudos de estabilidade no tempo de análise e ciclos de congelamento-descongelamento.

Analito	E (%)			
	Tempo de análise		Ciclos congelamento-descongelamento	
	Baixa ^a	Alta ^b	Baixa ^a	Alta ^b
(+)-(S)-VEN	8,8	-5,9	14,5	-0,3
(-)-(R)-VEN	8,0	6,3	14,1	12,2
(+)-(S)-N-VEN	-11,1	-14,4	-12,6	-10,9
(-)-(R)-N-VEN	-1,9	-12,3	-8,9	-12,1
(+)-(S)-O-VEN	-14,2	11,1	6,6	7,1
(-)-(R)-O-VEN	-9,2	8,5	-10,1	-5,9

^a Concentração baixa analisada – 12,5 ng mL⁻¹; ^b Concentração alta analisada – 375 ng mL⁻¹

Existem poucos métodos disponíveis para a determinação enantiosseletiva da VEN e de seus metabólitos em amostras de plasma, sendo que na maioria destes métodos, os autores empregaram a eletroforese capilar com detecção UV e a extração líquido-líquido como técnica de preparação das amostras (FANALI et al., 2001; RUDAZ et al., 2000; WEN; FENG; HUAN-DE, 2007; KINGBÄCK et al., 2010). O emprego de HPLC-ESI/MS é relatado em dois trabalhos, sendo que a fase estacionária baseada em antibiótico macrocíclico – vancomicina (coluna Chirobiotic V[®]) foi empregada em ambos estudos. Nestes métodos, foram observados limites de quantificação de aproximadamente 1,0 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da VEN e 1,5 ng mL⁻¹ para os enantiômeros da O-VEN (WEN; FENG; HUAN-DE, 2007), N-VEN e NO-VEN (KINGBÄCK et al., 2010). Os limites de quantificação observados para o método desenvolvido nesse estudo são ligeiramente superiores aos relatados na literatura, porém, o uso de uma técnica bastante vantajosa no que se refere ao emprego de solventes orgânicos (HF-LPME) na etapa de preparação da amostra torna esse método muito promissor.

4.3.4 Aplicação do método de LPME/LC-MS-MS em estudos de disposição cinética da VEN

O método desenvolvido foi aplicado em estudos piloto de disposição cinética da VEN em ratos e humanos.

Uma solução aquosa de rac-VEN, na dose única de 75 mg Kg^{-1} , foi administrada aos ratos por via oral (gavagem) e as amostras de sangue foram coletadas em diferentes tempos (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 horas).

A disposição cinética da VEN em ratos indica enantiosseletividade com maior concentração plasmática da (+)-(S)-VEN (Figura 27). Estes dados estão de acordo com Wang e colaboradores (1992) que avaliaram a disposição cinética da VEN em ratos e observaram razões [(S)]/[(R)] de aproximadamente 5,5. Em relação aos nossos estudos *in vitro* realizados com microsomas de fígado de ratos, observa-se que o metabólito N-VEN apresenta perfil semelhante; já a O-VEN apresenta resultado oposto com maior concentração da forma (S)- no estudo *in vivo*.

Figura 27. Gráfico da concentração plasmática (média $\pm$ SD) versus tempo de coleta referente à análise das amostras de plasma de ratos após dose oral única da Venlafaxina racêmica (n=3).

A rac-VEN foi administrada a uma voluntária sadia em dose única de 75 mg e foram coletadas amostras de sangue nos tempos: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 12,0 e 24,0 horas após a administração.

A disposição cinética da VEN em humanos apresentou resultados semelhantes aos encontrados na literatura demonstrando enantiosseletividade (WEN; FENG; HUAN-DE, 2007; FANALI et al., 2001; RUDAZ et al., 2000) com maior concentração plasmática da (+)-(S)-VEN (Figura 28). Os dados demonstram a

metabolização rápida da VEN com produção significativa do seu metabólito principal, a O-VEN. Este metabólito desempenha um papel importante, pois apresenta a mesma atividade farmacológica da VEN, contribuindo, desta forma, com o efeito terapêutico deste fármaco. Os enantiômeros da N-VEN não foram identificados neste estudo piloto; este metabólito pode não ter sido formado durante o estudo (24 horas) ou pode ter sido formado em concentração muito baixa não podendo ser identificado pelas condições analíticas empregadas. Estes dados estão de acordo com os resultados observados por Kingbäck e colaboradores (2010), que evidenciaram concentrações baixas dos enantiômeros da N-VEN (aproximadamente $5,2 \text{ ng mL}^{-1}$) em amostras de plasma de pacientes sob tratamento crônico com a VEN.

Figura 28. Gráfico da concentração plasmática (média $\pm$ SD) *versus* tempo de coleta referente à análise das amostras de plasma humano após dose oral única da Venlafaxina racêmica ($n=3$).

4.4 Comparação entre o estudo de biotransformação *in vitro* e os estudos de disposição cinética da VEN em ratos e humanos

Neste trabalho os métodos analíticos desenvolvidos para determinação da VEN e seus metabólitos em matrizes biológicas (microssomas isolados de fígado de ratos e plasma) foram aplicados em estudos de biotransformação *in vitro* e em estudos de disposição cinética em duas espécies (ratos e humanos). O objetivo destes estudos foi avaliar a correlação do metabolismo entre as diferentes espécies

avaliadas e comparar os resultados obtidos nos estudos *in vitro* com os verificados nos estudos *in vivo*.

Inicialmente, pode-se observar que os resultados do estudo *in vitro* empregando microssomas de fígado de ratos são semelhantes aos obtidos com o estudo de disposição cinética em ratos para a N-VEN, com formação mais pronunciada deste metabólito e com produção prioritária do enantiômero (-)-(R). Os enantiômeros da O-VEN são produzidos em baixas proporções em ambos os estudos, sendo que existe uma inversão na proporção dos enantiômeros, com maiores concentrações da (-)-(R)-O-VEN no estudo *in vitro* e da (+)-(S)-O-VEN no estudo *in vivo*. Nos estudos *in vitro* avalia-se apenas a etapa de biotransformação, desta forma, a (-)-(R)-O-VEN pode também ter sido formada em maior proporção no estudo *in vivo*, porém ter sido mais rapidamente eliminada que a isoforma (+)-(S).

Os estudos de disposição cinética em ratos e humanos também evidenciaram diferenças importantes. Observa-se enantiosseletividade na biotransformação da VEN com a (-)-(R)-VEN sendo preferencialmente biotransformada, porém em humanos, forma-se a (-)-(R)-O-VEN em maior proporção enquanto que, em ratos, a (-)-(R)-N-VEN é preferencialmente formada.

Os roedores são os animais mais amplamente empregados nos estudos para se avaliar o comportamento farmacocinético de novos fármacos. Estes animais apresentam um ciclo reprodutivo curto, permitindo o crescimento de um grande número de indivíduos em um curto período de tempo, facilitando os estudos. Em contraste, os animais de maior porte, apesar de apresentarem ciclos reprodutivos longos, apresentam maior similaridade com os humanos (CASAL; HASKINS, 2005).

Existem diversas diferenças entre roedores e humanos que contribuem para as divergências de resultados eventualmente observadas em estudos de disposição cinética. As enzimas responsáveis pela biotransformação não são exatamente as mesmas e, além disso, a relação entre a massa de enzimas do CYP e o peso corpóreo (CYP/ grama de peso corpóreo) é muito maior nos roedores, podendo ser o fator responsável pela eliminação mais rápida de xenobióticos por ratos quando comparado aos humanos. Outros fatores fisiológicos tais como temperatura corporal e concentração de albumina sérica também podem interferir no comportamento do xenobiótico (MARTIGNONI; GROOTHUIS; KANTER, 2006).

Estudos de biotransformação *in vitro* da VEN demonstram que a O-desmetilação é mediada, principalmente, pelo CYP2D6 e a N-desmetilação pelo

CYP3A4 (SÁNCHEZ; HYTTEL, 1997; AMCHIN et al., 1999). A CYP2D6 é expressa em baixa quantidade nos humanos (~ 4%), embora seja responsável pela biotransformação de aproximadamente 30% dos fármacos comercializados. Nos ratos não existe especificamente a isoforma CYP2D6, sendo a enzima com maior similaridade genética a CYP2D1. A CYP3A4 representa 30% do total de enzimas do CYP450 em humanos e é responsável pela biotransformação de 50% dos fármacos comercializados (ZUBBER; ANZENBACHEROVA; ANZENBACHER, 2002). Nos ratos, a isoforma CYP3A62 é a mais similar à CYP3A4 dos humanos, porém, alguns pesquisadores não consideram os ratos modelos adequados para o estudo de fármacos biotransformados por esta enzima, uma vez que não existe a mesma especificidade em relação a alguns substratos como a rifampicina, por exemplo, que é considerado um indutor das CYP3A em humanos (LU; LI, 2001).

5 – CONCLUSÕES

Neste trabalho foram apresentados e discutidos os resultados referentes ao desenvolvimento, validação e aplicação de duas novas metodologias para análise enantiosseletiva da VEN e de seus dois principais metabólitos O-VEN e N-VEN em fração microssomal de fígado de ratos e plasma empregando HF-LPME/LC-UV_{is} e HF-LPME/LC-MS-MS. A HF-LPME foi usada pela primeira vez na análise da VEN e seus metabólitos e a grande vantagem dessa técnica em relação às técnicas tradicionais de extração é a utilização de quantidades muito pequenas de solventes orgânicos. Os métodos desenvolvidos empregam as colunas ChiralpaK AD[®] e ChiralpaK AD-H[®] com fases móveis compostas por hexano:2-propanol (95:5, v/v) + 0,025% de dietilamina (DEA) e metanol:etanol (70:30, v/v) + 0,025% de DEA, respectivamente. O uso dessas colunas na análise enantiosseletiva da VEN e seus metabólitos também não havia sido descrito na literatura. O método para a determinação da VEN e de seus metabólitos em fração microssomal de fígado de ratos foi desenvolvido empregando a detecção por UV-Vis e foi linear no intervalo de 200 a 5000 ng mL⁻¹. Para determinação da VEN e de seus metabólitos em amostras de plasma empregou-se a detecção por espectrometria de massas (MS) e o método foi linear no intervalo de 5 a 500 ng mL⁻¹. As condições de extração por HF-LPME foram otimizadas empregando planejamentos fatoriais e foram obtidas recuperações de 12-60%. Embora as recuperações tenham sido inferiores às relatadas nos métodos empregando técnicas tradicionais de extração, foram suficientes para obtenção de precisão e exatidão similares aos demais métodos descritos na literatura. Os limites de quantificação observados para os métodos desenvolvidos nesse estudo são ligeiramente superiores aos relatados na literatura, porém, o uso de uma técnica bastante vantajosa no que se refere ao emprego de solventes orgânicos (HF-LPME) na etapa de preparação da amostra torna esses métodos muito promissores.

Finalmente, os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados em estudos de biotransformação empregando a fração microssomal de fígado de ratos e em estudos pilotos de disposição cinética em ratos e humanos e sugerem biotransformação enantiosseletiva da VEN com predominância da (-)-(R)-O-VEN em humanos e da (-)-(R)-N-VEN em ratos.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, H. Y.; ALI, I. Optimization strategies for HPLC enantioseparation of racemic drugs using polysaccharides and macrocyclic glycopeptide antibiotic chiral stationary phase. **Farmaco**, Pavia, v. 57, p. 513-529, 2002.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – Re nº 899, de 29 de maio de 2003.

AGRANAT, I.; WAINSCHEIN, S. R. The strategy of enantiomer patents of drugs. **Drug Discov. Today**, Amsterdam, v.15, n. 5, p. 163-170, 2010.

AL-DIRBASHI, O. Y.; NAKASHIMA, K. Hyphenated chromatographic methods for biomaterials. **Biomed. Chromatogr.**, London, v. 14, p. 406-421, 2000.

AMCHIN, J.; ZARYCRANSKI, W.; TAYLOR, K. P.; ALBANO, D.; KLOCKOWSKI, P. M. Effect of venlafaxine on CYP1A2-dependent pharmacokinetics and metabolism of caffeine. **Drug Metab. Dispos.**, Baltimore, v. 39, p. 252-259, 1999.

ANDERSEN, S.; HALVORSEN, T. G.; BJERGAARD-PEDERSEN, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 963, p. 303–312, 2002.

ANDREWS, P. Praziquantel: mechanism of anti-schistosomal activity. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 29, p. 129-156, 1985.

ARDREY, R. E. Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction. Chichester: Wiley, 2003.

AVGERINOS, A.; NOORMOHAMMADI, A.; HUTT, A. J. Disposition of ibuprofen enantiomers following the oral administration of a novel controlled release formulation to healthy volunteers. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 68, p. 97-103, 1991.

BAKHTIAR, R.; MAJUMDAR, T. K. Tracking problems and possible solutions in the quantitative determination of small molecule drugs and metabolites in biological fluids using liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, New York, v. 55, p. 227-243, 2007.

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Substâncias enantiomericamente puras (SEP): a questão dos fármacos quirais. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 647–656, 1997.

BJERGAARD-PEDERSEN, S.; RASMUSSEN, K. E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 817, p. 3–12, 2005.

BONATO, P. S. Stereoselective analysis of drugs and metabolites by Chromatographic and Eletrophoretic Analysis Center group. **Bioanalysis**, London, v. 2, n. 2, p. 175-179, 2010.

BONATO, P. S.; BORTOCAN, R.; GAITANI, C. M.; PAIAS, F. O.; ILHA, M. H.; LIMA, R. P. Enantiomeric resolution of drugs and metabolites in polysaccharide and protein based chiral stationary phases. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 13, p. 190–199, 2002.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 683–691, 2005.

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

BROCKS, D. R. Drug Disposition in Three Dimensions: An Update on Stereoselectivity in Pharmacokinetics. **Biopharm. Drug Dispos.**, Chichester, v. 27, p. 387–406, 2006.

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. **J. Sep. Sci.**, Weinheim, v. 33, p. 2872-2880, 2010.

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

CASAL, M.; HASKINS, M. Large animal models and gene therapy. **Eur. J. Hum. Genet.**, New York, v. 14, n. 3, p. 266-272, 2005.

CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E.; BASSI, A. L.; CALAFATTI, S. A.; DEGANI, A. L. G. discriminação quiral por CLAE em carbamatos de polissacarídeos: desenvolvimento, aplicações e perspectivas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 49–57, 1997.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 689, p. 175–180, 1997.

CEDERBERG, C.; ANDERSSON, T.; SKANBERG, I. Omeprazole: pharmacokinetics and metabolism in man. **Sc. J. Gastroenterol.**, Omaha, v. 166, p. 33-40, 1989.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por Eletrospray: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

DA FONSECA, P.; DE FREITAS, L. A.; PINTO, L. F.; PESTANA, C. R.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of oxybutinin and N-desethyloxybutinin with application to an in vitro biotransformation study. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 875, p. 161–167, 2008.

DE GRANDE, S. M. B.; AQUINO NETO, F. R. A espectrometria de massa acoplada a espectrometria de massa EM-EM. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 191–199, 1990.

DE-OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

DE SANTANA, F. J. M.; MAGALHAES, I. R. S.; DA-FONSECA, P.; BARTH, T.; DE-OLIVEIRA, A. R. M. Analytical tools for the enantioselective analysis of drugs and metabolites. In: LOPES, N. P.; GUARATINI, T. Analytical Chemistry for Pharmaceutical and Medical Sciences, Kerala: Transworld Research Network, 2009.

DOS SANTOS, M. I. R.; BONATO, P. S. Enantioselective determination of chloroquine and its n-dealkylated metabolites in plasma using liquid-phase microextraction and LC-MS. **J. Sep. Sci.**, Weinheim, v. 31, p. 3106-3116, 2008.

EAP, C. B.; LESSARD, E.; BAUMANN, P.; BRAWAND-AMEY, M.; YESSINE, M. A.; O'HARA, G.; TURGEON, J. Role of CYP2D6 in the stereoselective disposition of venlafaxine in humans. **Pharmacogenetics**, London, v. 13, p. 39-47, 2003.

FANALI, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L.; DESIDERIO, C. Use of vancomycin silica stationary phase in packed capillary electrochromatography II. Enantiomer separation of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in human plasma. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 919, p. 195-203, 2001.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1158, p. 2-14, 2007.

GEX-FABRY, M.; RUDAZ, S.; BALANT-GORGIA A. E.; BRACHET, A.; VEUTHEY, J. L.; BALANT, L. P.; BERTSCHY, G. Steady-state concentration of venlafaxine enantiomers: model-based analysis of between-patient variability. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 58, p. 323-331, 2002.

GROSS, A. S.; HEUER, B.; EICHELBAUM, M. Stereoselective protein binding of verapamil enantiomers. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 37, n. 24, p. 4623-4627, 1988.

HAGINAKA, J. Recent progresses in protein-based chiral stationary phases for enantioseparations in liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 875, p. 12-19, 2008.

HAGINAKA, J. Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using liquid chromatogramaphic techniques. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 27, p. 357–372, 2002.

HO, T. S.; HALVORSEN, T. G.; BJERGAARD-PEDERSEN, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 998, p. 61-72, 2003.

HYNECK, M.; DENT, J.; HOOK, J. B. Chirality: pharmacological action and drug development. In: BROWN, C. (Ed) Chirality in drug design and synthesis. London: Academic Press, 1990.

HUANG, S. P.; HUANG, S. D. Determination of organochlorine pesticides in water using solvent cooling assisted dynamic hollow-fiber-supported headspace liquid-phase microextraction. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1176, p. 19-25, 2007.

IKAI, T.; YAMAMOTO, C.; KAMIGAITO, M.; OKAMOTO, Y. Immobilized-type chiral packing materials for HPLC based on polysaccharide derivatives. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 875, p. 2-11, 2008.

KALRA, B. S. Cytochrome P450 enzyme isoforms and their therapeutic implications: An update. **Indian J. Med. Sci.**, Bombay, v. 61, n. 2, p. 102-116, 2007.

KAMATH, J.; HANDRATTA, V. Desvenlafaxine succinate for major depressive disorder: a critical review of evidence. **Expert. Rev. Neurother.**, London, v. 8, p. 1787-1797, 2008.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends Anal. Chem.**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 232–244, 2003.

KIM, K. B.; LEE, D. J.; YEO, C. W.; SHIN, J. G.; BAE, S. K. Simultaneous quantification of rosiglitazone and its two major metabolites, N-desmethyl and p-hydroxy rosiglitazone in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 877, p. 1951-1956, 2009.

KINGBACK, M.; JOSEFSSON, M.; KARLSSON, L.; AHLNER, J.; BENGTSSON, F.; KUGELBERG, F. C.; CARLSSON, B. Stereoselective determination of venlafaxine and its three demethylated metabolites in human plasma and whole blood by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometric detection and solid phase extraction. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 53, p. 583-590, 2010.

KOSTIAINEN, R.; KAUPPILA, T. J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1216, p. 685-699, 2009.

LAKE, B. G. Preparation and Characterization of Microsomal Fractions for Studies on Xenobiotic Metabolism. In: **Biochemical Toxicology – a practical approach**. Oxford, IRL PRESS, cap. 8, p. 183-215, 1987.

LÄMMERHOFER, M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1217, p. 814-856, 2010.

LLISZ, I.; BERKECZ, R.; PETER, A. Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1216, p. 1845-1860, 2009.

LOURENÇO, T. C.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2155-2164, 2010.

LU, C.; LI, A. P. Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig and beagle dog. **Chem. Biol. Interact.**, Amsterdam, v. 134, p. 271-281, 2001.

MAIER, N. M.; FRANCO, P.; LINDNER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 906, p. 3-33, 2001.

MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G. M. M.; KANTER, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. **Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.**, London, v. 2, n. 6, p. 875-894, 2006.

MATTHIJS, N.; MOHAMED MAFTOUH, M.; HEYDEN, Y. V. Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals IV. Polar organic solvent chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1111, p. 48-61, 2006.

MCCONATHY, J.; OWENS, M. J. Stereochemistry in drug action. **J. Clin. Psychiatry**, Memphis, v. 5, p. 70-73, 2003.

MITCHELL, C. R.; BENZ, N. J.; ZHANG, S. Comparison of the factors that contribute to retention of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases and macrocyclic glycopeptides chiral phases with the Abraham model. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 875, p. 65-71, 2008.

MIZUSHIMA, H.; TAKANAKA, K.; ABE, K.; FUKAZAWA, I.; ISHIZUKA, H. Stereoselective pharmacokinetics of oxybutynin and N-desethyloxybutynin in vitro and in vivo. **Xenobiotica**, London, v. 37, p. 59-73, 2007.

NOEL, F.; VOLPATO, N.; RIBEIRO, A.; BOLUTARI, E.; CUPELLO, T. Estudos de bioequivalência para fármacos que apresentam estereoisomerismo. **Infarma**, Brasília, v. 16, p. 11-12, 2004.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 29, p. 1401-1406, 2006.

OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 666, p. 403-419, 1994.

OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E. Polysaccharide derivatives for chromatographic separation of enantiomers. **Angew. Chem. Int. Edit.**, Weinheim, v. 37, p. 1020-1043, 1998.

OTTON, S. V.; CHEUNG, S. W.; INABA, T.; RUDOLPH, R. L.; SELLERS, E. M. Venlafaxine oxidation in vitro is catalysed by CYP2D6. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 149-156, 1996.

PRESKORN, S. Pharmacotherapeutic profile of venlafaxine. **Eur. Psychiatry**, Paris, v. 12, p. 285-294, 1997.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends Anal. Chem.**, Amsterdam, v. 22, n. 10, p. 565-574, 2003.

RASMUSSEN, K. E.; BJERGAARD-PEDERSEN, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. **Trends Anal. Chem.**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 1-11, 2004.

RASMUSSEN, K. E.; BJERGAARD-PEDERSEN, S.; KROGH, M.; UGLAND, H. G.; GRONHAUG, T. Development of a single in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 873, p. 3–11, 2000.

RENTSCH, K. M. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. **J. Biochem. Biophys. Meth.**, Amsterdam, v. 54, p. 1–9, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RILEY, R. J.; GRIME, K. Metabolic screening in vitro: metabolic stability, CYP inhibition and induction. **Drug Discov. Today**, Amsterdam, v. 1, n. 4, p. 365-372, 2004.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L.; AGUILERA-LUIZ, M. M. Determination of ochratoxin A and T-2 toxin in alcoholic beverages by hollow fiber liquid phase microextraction and ultra high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, London, v. 82, n. 1, p. 171-176, 2010.

RUDAZ, S.; STELLA, C.; GORGIA, A. E. B.; FANALI, S.; VEUTHEY, J. L. Simultâneos stereoselective analysis of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine enantiomers in clinical samples by capillary electrophoresis using charged cyclodextrins. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 23, p. 107-115, 2000.

SÁNCHEZ, C.; HYTTEL, J., Comparision of the antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. **Cell. Mol. Neurobiol.**, New York, v. 19, n. 4, p. 467-489, 1997.

SANTORO, M. I. R. M.; SINGH, A. K. Development and regulation of chiral drug substances: an overview on worldwide pharmaceutical guidelines. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 259-268, 2001.

SHAH, K. G.; KELLERMAN, D. J.; DEGRAW, S.; KOCH, P.; JUSKO, W. J. Pharmacokinetic and Pharmacodynamics of cumulative single doses of inhaled salbutamol enantiomers in asthmatic subjects. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, London, v. 12, p. 353-362, 1999.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I. J.; SKELLY, J. P.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C. T.; COOK, C. E.; MCDOWALL, R. D.; PITTMAN, K. A.; SPECTOR, S. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v. 8(3), p. 309-312, 1992.

SILVA, M. G.; OCANÃS, L. G.; TORRES, N. W.; LÓPEZ, A. P. Detección de los metabolitos de la toxina T-514 (Peroxisomicina A1) del género *Karwinskia* *in vivo* e *in vitro*. **Cien. Uanl**, Monterrey, v. 5, p. 485–492, 2002.

SIMÕES, R. A.; DE-OLIVEIRA, A. R.; BONATO, P. S. Hollow fiber-based liquid-phase microextraction (HF-LPME) of isradipine and its main metabolite followed by chiral HPLC analysis: application to an *in vitro* biotransformation study. **Anal. Bioanal. Chem.**, Hiedelberg, v. 399, p. 2435-2443, 2011.

SMITH, R. M. Before the injection – modern methods of sample preparation for separation techniques. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1000, p. 3-27, 2003.

SRINIVAS, N. R. Drug disposition of chiral and achiral drug substrates metabolized by cytochrome P450 2D6 isozyme: case studies, analytical perspectives and developmental implications. **Biomed. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 20, p. 466–491, 2006.

TANG, Y., Significance of mobile phase composition in enantio-separation of chiral drugs by HPLC on a cellulose based chiral stationary phase. **Chirality**, New York, v. 8, p.136-142, 1996.

TAO, Y.; LIU, J. F.; HU, X. L.; LI, H. C.; WANG, T.; JIANG, G. B. Hollow fiber supported ionic liquid membrane microextraction for determination of sulfonamides in

environmental water samples by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1216, p. 6259-6266, 2009^a.

TAO, Y.; LIU, J. F.; WANG, T.; JIANG, G. B. Simultaneous conduction of two- and three-phase hollow-fiber-based liquid-phase microextraction for the determination of aromatic amines in environmental water samples. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1216, p. 756-762, 2009.

TESTA, B. Chiral aspects of drug metabolism. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v. 7, p. 60-64, 1986.

THOMPSON, R. A practical guide to HPLC enantioseparations for pharmaceutical compounds. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.**, New York, v. 28, p. 1215-1231, 2005.

THUNBERG, L.; HASHEMI, J.; ANDERSSON, S. Comparative study of coated and immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases and their applicability in the resolution of enantiomers. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 875, p. 72-80, 2008.

TINGLE, M. D.; HELSBY, N. A. Can in vitro metabolism studies with human tissue replace in vivo animal studies? **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 21, p. 184-190, 2006.147, 2006.

TRIGGLE, D. J. Stereoselectivity of drug action. **Drug Discov. Today**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 138-147, 1997.

TUCKER, G. T.; LENNARD, M. S. Enantiomer specific pharmacokinetics. **Pharmac. Ther.**, Oxford, v. 45, p. 309-329, 1990.

VU, R. L.; HELMESTE, D.; ALBERS, L.; REIST, C. Rapid determination of venlafaxine and O- desmethylvenlafaxine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 703, p. 195-201, 1997.

VOGESER, M.; SEGER, C. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory – goals for further developments. **Clin. Biochem.**, Oxford, v. 41, p. 649-662, 2008.

WARD, T. J.; FARRIS, A. B. Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 906, p. 73-89, 2001.

WANG, C. P.; HOWELL, S. R.; SCATINA, J.; SISENWINE, S. F. The disposition of venlafaxine enantiomers in dogs, rats, humans receiving venlafaxine. **Chirality**, New York, v. 84-90, 1992.

WANG, S.; REN, L.; LIU, C.; GE, J.; LIU, F. Determination of five polar herbicides in water samples by ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. **Anal. Bioanal. Chem.**, Hiedelberg, v. 397, p. 3089-3095, 2010.

WEN, L.; FENG, W.; HUAN-DE, L. Simultaneous stereoselective analysis of venlafaxine and *O*-desmethylvenlafaxine enantiomers in human plasma by HPLC-ESI/MS using a vancomycin chiral column. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 850, p. 183-189, 2007.

YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Chiral discrimination on polysaccharides derivatives. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, Tokyo, v. 68, p. 3289-3307, 1995.

ZHANG, Y.; NGUYEN, D.; FRANCO, P. Enantiomer resolution screening strategy using multiple immobilised polysaccharide-based chiral stationary phases. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 1191, p. 214-222, 2008.

ZHANG, Y.; WU, D. R.; WANG-IVERSON, D. B.; TYMIAK, A. A. Enantioselective chromatography in drug discovery. **Drug Discov. Today**, Oxford, v. 10, p. 571-577, 2005.

ZHAO, L.; ZHU, L.; LEE, H. K. Analysis of aromatic amines in water samples by liquid-liquid-liquid microextraction with hollow fibers and high performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 963, p. 239-248, 2002.

ZUBER, R.; ANZENBACHEROVA, E.; ANZENBACHER, P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. **J. Cell Mol. Med.**, Bucharest, v. 6, p. 189-198, 2002.