UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Métodos de análise da rosiglitazona e pioglitazona e de seus principais
metabólitos: aplicações em estudos de metabolismo *in vitro*

Leandro Augusto Calixto

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Métodos de análise da rosiglitazona e pioglitazona e de seus principais
metabólitos: aplicações em estudos de metabolismo *in vitro*

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Ciências Farmacêuticas
para a obtenção do Título de Doutor
em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos
e Cosméticos.

Orientado: Leandro Augusto Calixto
Orientadora: Prof^a Dr^a Pierina Sueli Bonato

Versão corrigida da **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós
graduação em 02/04/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2012

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

Calixto, Leandro Augusto

Métodos de análise da rosiglitazona e pioglitazona e de seus principais metabólitos: aplicações em estudos de metabolismo *in vitro*. Ribeirão Preto, 2012.

148p.:il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Bonato, Pierina Sueli.

1. rosiglitazona. 2. pioglitazona. 3. microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (HF-LPME). 4. racemização. 5. metabolismo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leandro Augusto Calixto

Métodos de análise da rosiglitazona e pioglitazona e de seus principais metabólitos:
aplicações em estudos de metabolismo *in vitro*

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Ciências Farmacêuticas
para a obtenção do Título de Doutor
em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos
e Cosméticos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Pierina Sueli Bonato

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida, saúde e coragem de encarar mais uma etapa de minha vida.

Aos meus pais Osvaldo e Sônia pelo amor, confiança em mim depositada e apoio. Apesar das dificuldades, vocês sempre lutaram para que eu recebesse a maior herança dada a um filho: a EDUCAÇÃO. Obrigado e amo muito vocês.

À pessoa maravilhosa que tive o privilégio de conhecer durante a pós graduação, Greyce Kelly, agradeço pelo seu companheirismo, respeito, amor. Sou muito privilegiado de estar ao seu lado. Amo você.

Aos meus irmãos, Sarah e Renan, tenho muito orgulho de vocês.

Aos meus avós maternos: Oswaldo (*in memoriam*) e Ágar; e avós paternos: Antônio (*in memoriam*) e Lázara (*in memoriam*). Pelos bons momentos proporcionados e pela alegria contagiante que vocês me passaram ao seguir meu caminho.

Agradeço a todos meus familiares pelo o apoio.

Agradeço especialmente à Profa. Pierina, pela paciência e sabedoria de uma pessoa que para mim não é só um exemplo no meio acadêmico como também de caráter. Aprendi muito contigo nesse período de minha vida. Sou muito grato pelos seus ensinamentos e pela sua dedicação. Desejo-lhe tudo de melhor e muita felicidade nessa nova fase de sua vida. Obrigado de coração!

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Física e Química e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela possibilidade de desenvolver este projeto.

Aos colegas pós-graduandos do CROEC, Anderson, Fernando, Igor, Keyller, Thiago, Milena, Patrícia, Rodrigo pelos bons momentos, ajuda e pela troca de experiências e conhecimento.

Aos colegas funcionários do CROEC, Luciana, Roberto e Valquíria pela amizade e suporte para a execução deste projeto.

Aos professores e funcionários do Departamento de Física e Química.

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação.

Ao Prof. Anderson pela amizade, ensinamentos e colaboração.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro e pela bolsa de estudos.

RESUMO

CALIXTO, L. A. **Métodos de análise da rosiglitazona e pioglitazona e de seus principais metabólitos: aplicações em estudos de metabolismo *in vitro***. 2012. 148f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Estudos de metabolismo *in vitro* possuem o intuito de caracterizar e quantificar possíveis metabólitos, elucidar as vias metabólicas e sugerir modelos a serem seguidos para a realização de estudos *in vivo*. Com o intuito de estudar o metabolismo *in vitro* não estereosseletivo da rosiglitazona (RSG) empregando fração microssomal de fígado de ratos, foi desenvolvida uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV em 245 nm, para analisar a RSG e seus principais metabólitos, *p*-hidroxí rosiglitazona (*p*-OH-R) e *N*-desmetil rosiglitazona (*N*-Dm-R). Os analitos foram separados em fase reversa, utilizando uma coluna X-Terra MS C-18 (partículas de 3,5 μm) e fase móvel composta por água:acetonitrila:ácido acético (85:15:0,5, v/v/v), na vazão de 1 mL min⁻¹. Matrizes biológicas contêm um grande excesso de proteínas, lipídeos e outros materiais endógenos que interferem na análise de fármacos e metabólitos, tornando necessário um procedimento adequado de preparação das amostras antes da análise cromatográfica. A microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (HF-LPME) é uma técnica promissora para a preparação de amostras em estudos de metabolismo *in vitro*, pois, além de promover o *clean-up*, promove também o enriquecimento dos analitos na amostra. A HF-LPME foi aplicada pela primeira vez para a extração simultânea desse fármaco e seus metabólitos. O sistema de três fases foi escolhido como o mais apropriado, empregando uma solução de ácido clorídrico como fase aceptora e 1-octanol como solvente orgânico. A otimização dos demais parâmetros foi realizada através de planejamento fatorial fracionário. O método foi validado e foi linear no intervalo de 50-6000 ng mL⁻¹, apresentando limites de quantificação de 50 ng mL⁻¹ e recuperações acima de 47 % para a RSG e seus metabólitos (*p*-OH-R e *N*-Dm-R). O método validado foi empregado em um estudo de metabolismo *in vitro* com fração microssomal de fígado de ratos. Nesse estudo, foi possível estimar as constantes de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade inicial máxima (V_{max}). *N*-Dm-R e *p*-OH-R apresentaram valores de V_{max} de $87,30 \pm 8,04$ e $51,64 \pm 12,25$ $\eta\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$, respectivamente, enquanto que os valores de K_m foram de $58,14 \pm 11,85$ e $77,84 \pm 36,77$ mmol L⁻¹, respectivamente. Outros metabólitos foram observados nos cromatogramas e a identificação foi feita por espectrometria de massas: orto-hidroxi-rosiglitazona e *N*-desmetil-hidroxi-rosiglitazona. A RSG é comercializada como uma mistura racêmica, apesar de possuir sua atividade antidiabética relacionada essencialmente com o enantiômero (S). O centro quiral desse fármaco possui um grupo carbonila, por isso, o enantiômero (R) pode se converter no enantiômero (S) ou *vice-versa*, via tautomerismo cetoenólico. Dados da literatura indicavam que essa racemização poderia ser lenta o suficiente para possibilitar o estudo dos enantiômeros isoladamente. Entretanto, até o momento não há dados sobre a disposição cinética

e metabolismo enantiosseletivos desse fármaco. Sendo assim, propôs-se o desenvolvimento de metodologias analíticas para estudar a racemização da RSG e seus metabólitos e avaliar a possibilidade de estudar seu metabolismo *in vitro* de forma estereosseletiva. O método foi desenvolvido empregando HPLC com detecção em 245 nm. A separação dos enantiômeros do fármaco e metabólitos, também quirais, foi obtida empregando uma coluna Chiralcel OJ-H e fase móvel constituída por metanol:etanol (90:10; v/v), na vazão de 0,3 mL min⁻¹. O estudo de racemização mostrou que o fármaco e seus metabólitos são racemizados nas condições em que o estudo de metabolismo é conduzido. Finalmente, para estudar o metabolismo *in vitro* da pioglitazona (PGZ), foi desenvolvido um método para análise desse fármaco e de seus principais metabólitos, a hidroxipioglitazona (M-IV) e a cetopioglitazona (M-III) empregando a eletroforese capilar (CE). As análises foram realizadas em capilar de sílica de 50 µm de diâmetro interno e com comprimento efetivo de 40 cm, utilizando tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 2,5, detecção em 190 nm, tensão de 30 kV e temperatura do capilar de 35 °C. A HF-LPME também foi empregada para a preparação das amostras. O sistema de três fases foi escolhido, empregando solução de ácido clorídrico como fase aceptora e o 1-octanol como solvente orgânico. A otimização dos demais parâmetros foi realizada através de planejamento fatorial fracionário. O método validado foi linear no intervalo de 200 – 25000 ng mL⁻¹ para PGZ e 200 – 2000 ng mL⁻¹ para os metabólitos, apresentando limites de quantificação de 200 ng mL⁻¹ e recuperações acima de 19 % para a RSG e seus metabólitos M-IV e M-III. O método validado foi empregado em um estudo de metabolismo *in vitro* contendo fração microssomal de fígado de ratos, mas nesse estudo, não foi possível observar a formação dos metabólitos. Entretanto, esse método pode ser usado em outros modelos de metabolismo *in vitro* (microssomas humanos), nos quais se observa a formação desses metabólitos em concentrações maiores.

Palavras-chave:rosiglitazona, pioglitazona, microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (HF-LPME), racemização, metabolismo

ABSTRACT

CALIXTO, L. A. **Methods for the analysis of rosiglitazone and pioglitazone and their metabolites: application to *in vitro* metabolism studies.** 2012. 148f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

In vitro metabolism studies have been used to characterize and to quantify possible metabolites, to elucidate metabolic pathways and to suggest models to perform *in vivo* studies. So the purpose of this study was to evaluate the *in vitro* rosiglitazone (RSG) metabolism employing microsomal fraction obtained from rat livers. A high-performance liquid chromatography (HPLC) method with UV detection at 245 nm was developed to analyze RSG and the main metabolites, *p*-hydroxy rosiglitazone (*p*-OH-R) e *N*-desmethyl rosiglitazone (*N*-Dm-R). The analytes were separated under reversed phase conditions, using a X-Terra MS C-18 column (3.5 μm particle size) and a mobile phase consisting of water:acetonitrile:acetic acid (85:15:0.5, v/v/v), at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Biological matrices contain a large excess of proteins, lipids and other endogenous compounds that interfere in the analysis of drugs and metabolites. So, a suitable sample preparation technique is required. Hollow-fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) is a promising technique for the preparation of biological samples. Besides the clean-up, analytes enrichment is also achieved. HF-LPME for the simultaneous analysis of RSG and its main metabolites is described for the first time. The three-phase extraction was performed using hydrochloride acid solution as acceptor phase and 1-octanol as organic solvent. The other parameters were optimized by fractional factorial design. The method was validated and it was linear over the concentration range of 50-6000 ng mL⁻¹, with quantification limits of 50 ng mL⁻¹ and recoveries above 47 %. The validated method was used to estimate Michaelis-Menten (K_m) constant and maximum initial velocity (V_{max}). *N*-Dm-R e *p*-OH-R showed V_{max} values of 87.30 ± 8.04 and 51.64 ± 12.25 $\eta\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$, respectively, while the K_m values were 58.14 ± 11.85 e 77.84 ± 36.77 mmol L⁻¹, respectively. Other possible metabolites were observed in the chromatograms and they were identified by mass spectrometry: ortho-hydroxy-rosiglitazone e *N*-desmethyl-hydroxy-rosiglitazone. RSG is marketed as a racemic mixture although the antidiabetic activity is related essentially to the (S)-enantiomer. The chiral center has a carbonyl group, therefore the (R)-enantiomer could be transformed to the (S)-enantiomer or *vice-versa* by keto-enolic tautomerism. The literature indicates that this racemization is slow enough to allow the evaluation of the properties of the isolated enantiomers. However, there is no information in the literature about enantioselective RSG kinetic disposition and metabolism. Considering this facts, an analytical procedure was developed to study the racemization of RSG and its metabolites under different conditions and to determine if the enantioselective metabolism would be performed. The method was developed by HPLC with detection at 245 nm. The chiral separation of RSG and metabolites was achieved on a Chiralcel OJ-H column, with the mobile phase consisting of methanol:ethanol (90:10,v/v). The results obtained showed that the racemization occurs under the conditions used in *in vitro*

metabolism studies. Finally, to study the *in vitro* metabolism of pioglitazone (PGZ), another method was developed by capillary electrophoresis (CE) to determine this drug and its main metabolites, hydroxy-pioglitazone (M-IV) and keto-pioglitazone (M-III). The analyses were conducted using a fused silica capillary (50 μm inner diameter and 40 cm effective length), sodium phosphate buffer 50 mmol L^{-1} , pH 2.5, detection at 190 nm, voltage of 30 kV and capillary temperature of 35°C. HF-LPME was also used for sample preparation with hydrochloride acid solution as acceptor phase and 1-octanol as organic solvent. The other parameters were optimized by fractional factorial design. The method was validated showing to be linear in the concentration range of 200 – 25000 ng mL^{-1} for PGZ and 200 – 2000 ng mL^{-1} for the metabolites. Quantification limits were 200 ng mL^{-1} for all analytes and the recoveries were higher than 19%. The validated method was used to study the *in vitro* metabolism of PGZ by rat liver microsomal fraction, but it was not possible to observe the formation of the metabolites in this study. However this method could be used in other *in vitro* metabolism models (human microsome), in which higher concentrations of these metabolites are observed.

Keywords: rosiglitazone, pioglitazone, hollow-fiber liquid phase microextraction (HF-LPME), racemization, metabolism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. RSG e seus principais metabólitos (<i>N</i> -Dm-R e <i>p</i> -OH-R).....	9
Figura 2. PGZ e seus principais metabólitos (M-IV - hidroxipioglitazona e M-III - ceto-pioglitazona).....	9
Figura 3. Princípio da microextração em fase líquida (LPME).....	16
Figura 4. Fotos ilustrativas contendo (A) membrana de polipropileno, (B) unidade de HF-LPME (membrana de polipropileno, duas ponteiros empregadas na eletroforese em gel e uma tampa empregada em eletroforese capilar) e (C) unidade de HF-LPME inserida no tubo de extração (Adaptado de Magalhães e Bonato, 2008).....	20
Figura 5. Desenho esquemático dos principais componentes do sistema de eletroforese capilar.....	24
Figura 6. Cromatograma referente à análise de (1) <i>N</i> -Dm-R, (2) RSG e (3) <i>p</i> -OH-R. Condições cromatográficas: Coluna X-Terra MS C-18 (100 mm × 3,9 mm, partículas de 3,5 µm), utilizando água:acetonitrila:ácido acético (85:15:0,5, v/v/v) como fase móvel, sob condições isocráticas, temperatura de 22 °C, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e detecção em 245 nm.	55
Figura 7. Avaliação da influência do solvente orgânico (acetato de dodecila (A), éter <i>n</i> -hexílico (B) e 1-octanol(C)) e do ácido empregado como fase aceptora (ácido clorídrico 0,01 mol L ⁻¹ , ácido trifluoroacético 0,1 mol L ⁻¹ e ácido perclórico 0,01 mol L ⁻¹).....	57
Figura 8. Influência dos fatores avaliados individualmente (pH da fase doadora, concentração de ácido da fase aceptora, agitação da amostra, adição de sal na fase doadora e tempo de extração) na eficiência de extração da RSG, <i>N</i> -Dm-R e <i>p</i> -OH-R na HF-LPME.....	59
Figura 9. Avaliação da seletividade do método para análise de RSG, <i>N</i> -Dm-R e <i>p</i> -OH-R em fração microsomal de fígado de ratos. (A) meio de incubação na ausência de RSG e seus principais metabólitos (<i>N</i> -Dm-R e <i>p</i> -OH-R), (B) meio de incubação na ausência da fração microsomal e (C) meio de incubação na ausência da solução NRS. Condições cromatográficas: Coluna X-Terra C-18 (100 mm × 3,9 mm, partículas de 3,5 µm), utilizando água:acetonitrila:ácido acético (85:15:0,5, v/v/v) como fase móvel, à 22 °C, sob condições isocráticas, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e detecção em 245 nm. O pico que aparece em 9 minutos corresponde à RSG.....	62
Figura 10. Avaliação da robustez do método de análise de RSG, <i>N</i> -Dm-R e <i>p</i> -OH-R em fração microsomal de fígado de ratos, representada pelo Gráfico de Pareto. Rs1 corresponde à resolução entre os picos de <i>N</i> -Dm-R e RSG, enquanto que Rs2 corresponde à resolução entre RSG e <i>p</i> -OH-R.....	63
Figura 11. Cromatogramas referentes à análise de (A) meio microsomal fortificado com os analitos (concentração de 2000 ng mL ⁻¹), (B) meio de incubação na	

ausência do sistema NRS. (C) meio de incubação na ausência da fração microsomal. Condições cromatográficas: Coluna X-Terra C-18 (100 mm x 3,9 mm, partículas de 3,5 μm), utilizando água:acetonitrila:ácido acético (85:15:0,5, v/v/v) como fase móvel, à 22°C, sob condições isocráticas, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em 245 nm. (1) *N*-Dm-R, (2) RSG e (3) *p*-OH-R.....65

Figura 12. Definição do intervalo linear para a formação dos metabólitos *N*-Dm-R e *p*-OH-R em função da concentração de proteínas microsomais no meio de incubação. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4, tempo de incubação de 20 minutos, concentração do substrato (RSG) 10,56 mol L⁻¹. (5000 ng mL⁻¹).66

Figura 13. Definição do intervalo linear para a formação dos metabólitos *N*-Dm-R e *p*-OH-R em função do tempo de incubação. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4, concentração de proteínas microsomais de 0,8 mg por mL de meio de incubação, concentração do substrato de 10,56 mol L⁻¹ (5000 ng mL⁻¹).67

Figura 14. Gráficos de Michaelis-Menten obtidos plotando o *slope* versus a concentração de substrato. Temperatura de incubação de 37°C, pH do meio 7,4 e concentração de proteínas microsomais de 0,8 mg por mL de meio de incubação.68

Figura 15. Picos observados nos estudos de metabolismo *in vitro* da RSG empregando fração microsomal de fígado de ratos. Concentração do substrato de 105,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tempo de incubação de 60 min, temperatura de incubação de 37°C, pH do meio de 7,4 e concentração de proteínas microsomais de 0,8 mg por mL de meio de incubação.71

Figura 16. Tautomerismo cetoenólico da RSG (Adaptado de JAMALI et al., 2008). *Centro quiral.78

Figura 17. Separação dos enantiômeros da rosiglitazona e dos metabólitos na coluna Chiralcel OJ-R no modo polar orgânico. Picos n°1 – enantiômeros da *rac*-*N*-Dm-R, picos n°2 – enantiômeros da *rac*-*p*-OH-R e picos n°3 – enantiômeros da *rac*-RSG. Fase móvel: metanol 100% na vazão de 0,5 mL min⁻¹.86

Figura 18. Separação dos enantiômeros da RSG e metabólitos na coluna Chiralcel OJ-H no modo polar orgânico. Picos n°1- enantiômeros da *rac*-*N*-Dm-R, picos n°2- enantiômeros da *rac*-*p*-OH-R e picos n°3- enantiômeros da *rac*-RSG. Fase móvel constituída por metanol:etanol (90:10, v/v), temperatura do forno de 22°C e vazão de 0,3 mL min⁻¹.87

Figura 19. Separação dos enantiômeros da RSG e metabólitos na coluna Chiralpak AD-RH no modo polar orgânico. Picos n°1- enantiômeros da *rac*-*p*-OH-R, picos n°2- enantiômeros da *rac*-RSG e picos n°3- enantiômeros da *rac*-*N*-Dm-R. Fase móvel: metanol:isopropanol (60:40, v/v) e vazão de 0,5 mL min⁻¹.88

Figura 20. Cromatogramas referentes a análise da *rac*-RSG (A), *rac*-*p*-OH-R (B) e *rac*-*N*-Dm-R (C) na coluna Chiralcel OJ em fase normal. Fase móvel: hexano:etanol: isopropanol (50:25:25, v/v/v) e vazão de 0,6 mL min⁻¹.90

Figura 21. Cromatograma referente a análise da *rac*-RSG (A), *rac*-*p*-OH-R (B) e *rac*-*N*-Dm-R (C) na coluna Chiralcel OJ-H em fase normal. Fase móvel: hexano:etanol:isopropanol:metanol (50:20:20:10, v/v/v/v) e vazão de 0,8 mL min⁻¹. .91

Figura 22. Planejamento Fatorial Completo (Pareto) com três fatores (concentração de substrato, tipo de tampão e concentração do tampão) e dois níveis, totalizando 8 experimentos, para avaliar a racemização da RSG, *N*-Dm-R e *p*-OH-R em condições aplicadas em estudos de metabolismo *in vitro*.95

Figura 23. Eletroferogramas mostrando a separação de PGZ (2), seus metabólitos M-IV (3) e M-III (4) e o padrão interno RSG (1) em função da tensão aplicada no capilar e temperatura. Condições de análise: tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 2,5 e detecção em 190 nm. (A) tensão de 20 kV e temperatura de 25 °C; (B) tensão de 20 kV e temperatura de 35°C e (C) tensão de 30 kV e temperatura de 35°C. 111

Figura 24. Eletroferogramas mostrando a separação de PGZ (1) e seus metabólitos M-IV (2) e M-III (3) em função da concentração do eletrólito. Condições de análise: tampão fosfato de sódio (A) 25 mmol L⁻¹, (B) 50 mmol L⁻¹ e (C) 80 mmol L⁻¹, pH 2,5, tensão de 30 kV, temperatura de 35°C e detecção em 190 nm. 111

Figura 25. Influência das soluções ácidas na eficiência da extração da PGZ e seus metabólitos. Condições da HF-LPME: 1-octanol como solvente orgânico, tempo de extração de 30 minutos, agitação de 1500 rpm e pH final da fase doadora de 6,0. 114

Figura 26. Influência dos fatores avaliados individualmente (pH da fase doadora, concentração de ácido da fase aceptora, agitação da amostra e tempo de extração) na eficiência de extração da RSG (padrão interno), PGZ, M-IV e M-III por HF-LPME..... 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos bioanalíticos para análise das TZD's em matrizes biológicas	10
Tabela 2. Fatores estudados no planejamento fatorial fracionário na otimização da HF-LPME.....	49
Tabela 3. Fatores estudados no planejamento fatorial fracionário na avaliação da robustez do método.....	51
Tabela 4. Dosagem de proteínas totais	53
Tabela 5. Parâmetros cromatográficos obtidos nas condições otimizadas.....	56
Tabela 6. Recuperação do método para a análise de RSG, <i>N</i> -Dm-R e <i>p</i> -OH-R em fração microsomal de fígado de ratos.....	60
Tabela 7. Linearidade e LQ do método para a análise de RSG, <i>N</i> -Dm-R e <i>p</i> -OH-R em fração microsomal de fígado de ratos.....	61
Tabela 8. Precisão e exatidão do método para a análise de RSG, <i>N</i> -Dm-R e <i>p</i> -OH-R em fração microsomal de fígado de ratos	61
Tabela 9. Avaliação da formação dos principais metabólitos frente a diferentes concentrações de substrato (RSG), através da regressão linear simples pelo método dos mínimos quadrados	68
Tabela 10. Constantes de Michaelis-Menten e V_{max} obtidos através do estudo de cinética enzimática para a formação dos principais metabólitos da RSG	69
Tabela 11. Tempos de retenção, razão m/z $[M+H]^+$, fragmento monitorado na transição e estrutura molecular dos metabólitos formados após metabolismo <i>in vitro</i> empregando a fração microsomal de fígado de ratos.	72
Tabela 12. Fases estacionárias quirais empregadas	82
Tabela 13. Taxa de racemização (<i>K</i>) e meia-vida ($t_{0,5}$) dos enantiômeros da RSG, <i>N</i> -Dm-R e <i>p</i> -OH-R em função da variação de temperatura	93
Tabela 14. Taxa de racemização (<i>K</i>) e meia-vida ($t_{0,5}$) dos enantiômeros da RSG, <i>N</i> -Dm-R e <i>p</i> -OH-R em função da variação de pH	94
Tabela 15. Fatores avaliados durante a execução do planejamento fatorial completo.....	95
Tabela 16. Fatores estudados no planejamento fatorial fracionário na otimização da HF-LPME.....	107
Tabela 17. Parâmetros eletroforéticos obtidos nas condições otimizadas.....	113
Tabela 18. Recuperação do método de análise da PGZ em fração microsomal de fígado de ratos	116
Tabela 19. Recuperação do método de análise dos metabólitos M-IV e M-III em fração microsomal de fígado de ratos.....	116

Tabela 20. Linearidade e LQ do método de análise de PGZ, M-IV E M-III em fração microssomal de fígado de ratos	117
Tabela 21. Precisão e exatidão do método para análise de PGZ em fração microssomal de fígado de ratos	117
Tabela 22. Precisão e exatidão do método para análise dos metabólitos M-IV e M-III em fração microssomal de fígado de ratos.....	118
Tabela 23. Estudo de estabilidade na temperatura de incubação por 1 hora e em temperatura ambiente por 12 horas	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aceti-CoA	Acetil-coenzima A
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
API	Ionização à pressão atmosférica
CE	Eletroforese capilar
CYP-450	Citocromo P-450
DLLME	microextração líquido-líquido dispersiva
DTT	Ditiotreitol
EMA	European Medicines Agency
EOF	Fluxo eletroosmótico
ESI	Eletronebulização
FD	Fluorescência
FDA	Food and Drug Administration
GC	Cromatografia gasosa
GST	Glutathione S-transferase
GT	Glutathione
HF-LPME	Microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
[k]	Taxa de racemização
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LLE	Extração líquido-líquido
LPME	Microextração em fase líquida
M-III	Ceto-pioglitazona
M-IV	Hidroxi-pioglitazona
MS	Espectrometria de massas
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAT	N-acetiltransferase
N-Dm-R	N-desmetil rosiglitazona
NRS	<i>NADPH regenerating system</i>

PGZ	Pioglitazona
PPT	Precipitação por proteína
p-OH-R	p-hidroxi rosiglitazona
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PAPS	Adenosina-3'-fosfato-5'-fosfosulfato
RSG	Rosiglitazona
SDME	Microextração em gota suspensa
SLE	Extração com fase líquida suportada em membrana
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
SRM	Monitoramento de reações selecionadas
ST	Sulfotransferase
$t_{0,5}$	Tempo de meia-vida
TZD's	Tiazolidinedionas
UDPGA	Ácido uridino difosfoglucurônico
UGT	Uridina difosfoglucuronosil transferase
UHPLC	Cromatografia líquida de ultraeficiência
UV	Ultravioleta
$V_{\max}$	Velocidade máxima da reação enzimática

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
CAPÍTULO 1	
1.1 ESTUDOS DE METABOLISMO <i>IN VITRO</i>	2
1.2 DIABETES MELLITUS E FÁRMACOS ANTIDIABÉTICOS	5
1.2.1 Fármacos selecionados para esse estudo.....	7
1.3 TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	12
1.3.1 Microextração em fase líquida com membranas cilíndricas ocas (HF-LPME).....	17
1.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA ANÁLISE DE FÁRMACOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS.....	21
1.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência	21
1.4.2 Eletroforese Capilar	23
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
CAPÍTULO 2	
CAPÍTULO 3	
3.1. INTRODUÇÃO.....	41
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	43
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.3.1 Análise cromatográfica	44
3.3.2 Microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (HF-LPME)	46
3.3.3 Validação da metodologia analítica	49
3.3.4 Metabolismo <i>in vitro</i>	51
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.4.1 Condições cromatográficas	54
3.4.2 Microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (HF-LPME)	56
3.4.3 Validação da metodologia analítica	60
3.4.4. Metabolismo <i>in vitro</i>	64
3.4.4.1 Determinação da cinética de formação dos principais metabólitos da RSG: <i>N</i> -Dm-R e <i>p</i> -OH-R	64
3.4.4.2 Identificação de outros metabólitos formados no estudo de metabolismo	70
3.5 CONCLUSÕES.....	73
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
CAPÍTULO 4	
4.1 INTRODUÇÃO	78
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	80
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	81

4.3.1 Separação dos enantiômeros da rosiglitazona e de seus principais metabólitos empregando fases estacionárias quirais	81
4.3.2 Estudo de racemização	82
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
4.4.1 Separação dos enantiômeros da rosiglitazona e de seus principais metabólitos empregando fases estacionárias quirais	85
4.4.1.1 Modo polar orgânico	85
4.4.1.2 Fase normal.....	89
4.4.2 Estudo de racemização	92
4.5 CONCLUSÕES.....	97
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

CAPÍTULO 5

5.1 INTRODUÇÃO	101
5.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	102
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	103
5.3.1. Otimização da análise por eletroforese capilar	103
5.3.2. Microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (HF-LPME)	105
5.3.3. Validação da metodologia analítica	107
5.3.4. Metabolismo <i>in vitro</i>	109
5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
5.4.1 Condições eletroforéticas	110
5.4.2 Microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (HF-LPME)	113
5.4.3 Validação da metodologia analítica	115
5.4.4 Metabolismo <i>in vitro</i>	119
5.5 CONCLUSÕES.....	121
5.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

CAPÍTULO 6

ANEXOS

ANEXO 1	128
---------------	-----

CAPÍTULO 1.

Introdução Geral

Esse trabalho tem por finalidade o desenvolvimento de métodos para estudar o metabolismo *in vitro* da rosiglitazona (RSG) e pioglitazona (PGZ). Esses dois fármacos antidiabéticos, pertencentes à classe das tiazolidinedionas (TZD's), são comercializados como mistura racêmica. Sabendo que a interação de dois enantiômeros com uma macromolécula quiral, como exemplo, uma enzima ou receptor, resulta em propriedades farmacocinéticas e dinâmicas enantiosseletivas (CAMPO, BERNARDES e CARVALHO, 2009), a possibilidade de estudar o metabolismo de forma estereosseletiva também foi avaliada. Apesar de Jamali et al. (2008) terem descrito que esses dois fármacos sofrem um processo de racemização, os dados mostram que esse processo pode ser lento o suficiente para possibilitar a realização de estudos enantiosseletivos.

Os resultados obtidos estão sendo apresentados em três capítulos: i) determinação da RSG e seus principais metabólitos empregando a microextração em fase líquida com membranas cilíndricas ocas (HF-LPME) para preparação das amostras e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por absorção no ultravioleta (HPLC-UV); esse método foi aplicado em um estudo de metabolismo *in vitro*, empregando fração microssomal de fígado de ratos, ii) desenvolvimento de uma separação quiral da RSG e de seus principais metabólitos por HPLC-UV e estudo do processo de racemização desse fármaco, visando determinar a possibilidade de realizar o estudo de seu metabolismo de forma enantiosseletiva e, iii) determinação da PGZ e seus principais metabólitos empregando a HF-LPME e eletroforese capilar (CE) com detecção UV, com aplicação em estudos de metabolismo *in vitro* com fração microssomal de fígado de ratos.

1.1 Estudos de metabolismo *in vitro*

Estudos de metabolismo *in vitro* possuem o intuito de caracterizar e quantificar possíveis metabólitos, elucidar as vias metabólicas e sugerir modelos a serem seguidos para a realização de estudos *in vivo*. Esses estudos fornecem informações a respeito de reações adversas de potenciais fármacos, se um composto tóxico poderá ser detoxificado, ou o contrário, quando um determinado

composto aparentemente seguro pode ser metabolizado em um metabólito tóxico. O metabolismo envolve reações de fase I, onde compostos apolares são convertidos em compostos mais polares por reações de oxidação, redução e hidrólise, e fase II, onde ocorrem reações de conjugação com ácido glicurônico, sulfato, etc (JIA e LIU, 2007; ASHA e VIDYAVATHI, 2010).

Esse tipo de estudo possui as vantagens de custo relativamente baixo e de ser facilmente executável quando comparado aos modelos *in vivo*. Os principais modelos de estudos *in vitro* incluem o uso de microsomas hepáticos e não hepáticos, supersomas, fração S9 e fração citosólica (JIA e LIU, 2007).

O metabolismo *in vitro* mediado por microsomas hepáticos é o modelo mais empregado tanto para a avaliação de reações de oxidação (fase I), as quais são mediadas por enzimas do citocromo P-450 (CYP-450) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) como cofator, quanto de reações de fase II, por exemplo a glicuronidação, que necessita da presença de ácido uridino difosfoglicurônico (UDPGA) como cofator. O uso da fração microsomal permite avaliar a influência de isoenzimas específicas na presença de inibidores específicos (ASHA e VIDYAVATHI, 2010). Microsomas hepáticos consistem de vesículas do retículo endoplasmático liso e são obtidos por centrifugação diferencial (PELKONEN et al., 1974). As principais vantagens do uso de microsomas hepáticos são: i) baixo custo e simplicidade de uso ii) um dos modelos mais bem caracterizados em estudos de metabolismo, iii) possibilidade de avaliação da variação inter-individual e, iv) a atividade enzimática da fração microsomal pode ser preservada mantendo o material em temperaturas abaixo de -70°C por muitos anos. Dentre as desvantagens, destacam-se: i) incerteza na correlação com dados *in vivo* devido as altas quantidades de CYP-450 e uridina difosfoglicuronosil transferase (UGT), não havendo competição com outras enzimas e, ii) condições de incubação *in vitro* (pH do meio de incubação, força iônica e adição de solventes orgânicos) necessitam ser estritamente controladas (ASHA e VIDYAVATHI, 2010).

O supersoma é obtido por engenharia genética de células de inseto infectadas por baculovírus, o qual é capaz de expressar a isoforma desejada do CYP ou da UGT. O c-DNA transfectado em células de insetos ou em células linfoblásticas de células B humanas expressam isoformas do CYP-450, sendo

essa, a principal vantagem do supersoma. Pode ser empregado em estudos de polimorfismos como também na avaliação da interação entre fármacos. A desvantagem em estudos de fase II é que o sítio ativo da UGT possui uma barreira lipofílica, resultando em reações de glicuronidação lentas, porém esse problema pode ser solucionado usando a alameticina para formar poros nessa barreira (ASHA e VIDYAVATHI, 2010).

As frações citosólicas de fígado contêm as enzimas de fase II (N-acetiltransferase (NAT), glutathione-S-transferase (GST) e sulfotransferase (ST)). Essas frações são obtidas por centrifugações diferenciais do homogeneizado de fígado, da mesma forma como são obtidos os microsomas hepáticos. Os cofatores necessários para essas enzimas são: Acetil-coenzima A (Acetil-CoA), ditioneitol (DTT) e sistema regenerador acetil-CoA para a NAT, GT para a GST e adenosina-3'-fosfato-5'-fosfosulfato (PAPS) para a ST. A grande vantagem desse modelo é a presença de somente 3 enzimas em altas concentrações. Assim, a capacidade de metabolismo pela NAT, ST e GSH pode ser estudada separadamente ou em combinação, dependendo do cofator adicionado (BRANDON et al., 2003).

A fração hepática S9 é formada pela fração microsomal e pela fração citosólica. Portanto, dependendo do cofator adicionado, tem-se as reações de fase I ou as reações de fase II ou uma combinação de ambas. A fração S9 é essencialmente utilizada em associação com o teste Ames, que é um teste *in vitro* simples e rápido de detecção de mutagenicidade de produtos químicos (MARON e AMES, 1983). O teste desempenha um papel crucial no desenvolvimento de novos fármacos e é utilizado para a previsão de possíveis efeitos mutagênicos. Muitas substâncias pró-carcinogênicas permanecem inativas até que sejam ativadas enzimaticamente. Essa ativação pode ser pelas enzimas hepáticas. Portanto, a fração S9 atua como modelo de bioativação. Se o fármaco for metabolizado em um produto mutagênico, esse será detectado pelo teste Ames (HAKURA et al., 1999).

O protocolo seguido para realização de um estudo de metabolismo *in vitro* inclui a incubação do fármaco de interesse com o sistema de metabolização selecionado. Para a execução desse protocolo, algumas condições precisam ser bem definidas, como: as concentrações das enzimas, cofatores, inibidores, substrato (fármaco), tempo de incubação, forma de amostragem (quando se pretende

estabelecer cinética enzimática), controle de temperatura e outros parâmetros necessários, definição do tampão, entre outros (JIA e LIU, 2007).

Uma das etapas do estudo de metabolismo *in vitro* é a determinação da cinética enzimática. Os dois principais parâmetros cinéticos empregados para analisar os resultados são: a constante de Michaelis-Menten (K_m) que expressa a concentração de substrato em que 50% da velocidade máxima é obtida (V_{max}) e a própria V_{max} (velocidade máxima da reação enzimática). O K_m indica a afinidade de uma enzima pelo substrato, quanto menor for o seu valor, maior a afinidade pela enzima (TRACY, 2008). O V_{max} indica a capacidade de depuração; quanto maior for o seu valor, maior será essa capacidade. A velocidade de formação dos metabólitos ou desaparecimento do substrato (V) para uma reação catalisada enzimaticamente e com um único substrato é dada pela equação de Michaelis-Menten, onde $[S]$ é a concentração do substrato.

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Para a condução de estudos de metabolismo *in vitro* confiáveis, primeiramente é necessário o uso de ferramentas analíticas confiáveis e adequadas para a preparação das amostras, análise quantitativa e elucidação estrutural dos metabólitos presentes na matriz biológica (ZHANG e KAMINSKY, 2008).

1.2 Diabetes mellitus e fármacos antidiabéticos

O diabetes mellitus é uma doença crônica caracterizada pela ineficiência do pâncreas na produção de insulina ou quando o corpo não consegue utilizá-la. Configura-se hoje como uma epidemia mundial, traduzindo-se em grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. O envelhecimento da população, a urbanização crescente e a adoção de estilos de vida pouco saudáveis, como sedentarismo, dieta inadequada e obesidade, são os grandes responsáveis pelo

aumento da incidência e prevalência do diabetes em todo o mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A Organização Mundial da Saúde (2004) estima que mais de 171 milhões da população mundial são acometidos por essa doença. A expectativa é que esse número duplique entre os anos de 2005 e 2030, devido, principalmente, à obesidade e a inatividade física da população. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a estimativa é um aumento de 150%. De acordo com o Ministério da Saúde (2007), o número de diabéticos na população adulta está acima dos 6 milhões de brasileiros.

As consequências humanas, sociais e econômicas são devastadoras. São 4 milhões de mortes por ano relacionadas ao diabetes e suas complicações (com muitas ocorrências prematuras), o que representa 9% da mortalidade mundial total. O grande impacto econômico ocorre notadamente nos serviços de saúde, como consequência dos crescentes custos do tratamento da doença e, sobretudo, das complicações como o tratamento de doenças cardiovasculares, a diálise por insuficiência renal crônica e as cirurgias para amputações de membros inferiores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A hiperglicemia é a principal desordem metabólica que caracteriza o diabetes, contribuindo significativamente para sérios danos ao organismo, afetando principalmente os nervos e os vasos sanguíneos. Basicamente, há duas formas de diabetes, o Tipo 1 e o Tipo 2. O Tipo 1 ocorre em indivíduos que produzem baixa ou nenhuma quantidade de insulina e geralmente é diagnosticado em crianças e adultos jovens, acometendo aproximadamente 5-10% dos indivíduos diabéticos. Os sintomas normalmente associados ao diabetes Tipo 1 incluem: poliúria, polidipsia, polifagia e perda involuntária de peso (os “4 Ps”). Outros sintomas que levantam suspeitas clínicas são: fadiga, fraqueza, letargia, prurido cutâneo e vulvar, balanopostite e infecções de repetição. Algumas vezes o diagnóstico é feito a partir de complicações crônicas como neuropatia, retinopatia ou doença cardiovascular aterosclerótica. Pessoas acometidas com o diabetes Tipo 1 necessitam de injeções diárias de insulina para sobreviverem (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A forma mais comum de diabetes é o Tipo 2. Nesse caso, o indivíduo possui um déficit relativo de insulina, resistência a esse hormônio e um quadro

hiperglicêmico. Portadores de diabetes Tipo 2 possuem um ou mais dos seguintes fatores agravantes: i) são obesos, ii) são provenientes de algum grupo étnico de maior risco (asiáticos, africanos ou de origem indígena provenientes da América, Ásia e Austrália), iii) possuem o histórico familiar de diabetes e/ou, iv) são mulheres que desenvolveram diabetes gestacional (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; LORENZATI et al., 2010).

Diabéticos do Tipo 2 podem apresentar os mesmos sintomas do diabetes Tipo 1, porém são mais difíceis de serem diagnosticados. Muitos pacientes apresentam-se assintomáticos e são diagnosticados muitos anos depois de serem acometidos pela doença. Praticamente 50% dessa população não sabem que são portadores do diabetes Tipo 2 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As causas modificáveis do diabetes Tipo 2 são uma alimentação inadequada (qualidade e quantidade) e inatividade física. Portanto, não é de surpreender que mudanças positivas no estilo de vida, quando realizadas, sejam tão efetivas na prevenção e controle do diabetes Tipo 2. Aliada à mudança de hábitos, faz-se necessária a terapia medicamentosa. Os medicamentos hipoglicemiantes empregados no tratamento do diabetes Tipo 2 são divididos basicamente em cinco classes, de acordo com o mecanismo de ação: i) sulfoniluréias (glipizida, glibenclamida, dentre outros), ii) biguanidas (metformina), iii) tiazolidinedionas (pioglitazona e rosiglitazona), iv) meglitinidas (repaglinida e nateglinida) e v) inibidores da alfa-glucosidade (acarbose e miglitol). Nos casos mais graves, recomenda-se a administração de insulina para obter um controle metabólico adequado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; LORENZATI et al., 2010).

1.2.1 Fármacos selecionados para esse estudo

Os fármacos pertencentes à classe das tiazolidinedionas (TZD's) são amplamente empregados para a redução da concentração sérica de glicose em pacientes que apresentam diabetes mellitus Tipo 2. Três representantes dessa

categoria terapêutica foram introduzidos no mercado: a troglitazona (retirada do mercado em 1997, devido a efeitos de hepatotoxicidade), a PGZ e a RSG (INZUCCHI, 2010).

Apesar de ser retirada do mercado, a troglitazona continua sendo alvo de estudos para elucidar os mecanismos de toxicidade hepatocelular. No ano de 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a agência reguladora europeia (EMA) proibiram o uso de medicamentos contendo RSG, alegando que a relação risco/benefício é desfavorável, especialmente pela alta probabilidade de doenças isquêmicas, tais como infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, parada cardíaca, derrames, isquemia do miocárdio e outros distúrbios cardíacos. Apesar de não proibir a comercialização, a agência reguladora americana (*Food and Drug Administration*, FDA), restringiu a comercialização de medicamentos contendo RSG. A PGZ possui um risco cinco vezes menor de insuficiência cardíaca em comparação à RSG e é o único TZD disponível no mercado sem restrições (NISSEN e WOLSKI, 2007; NISSEN e WOLSKI, 2010; ANVISA, 2010).

O alvo bioquímico para a ação das TZD's é o receptor nuclear ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), cuja função é a regulação de glicose, metabolismo de lipídeos e inflamação. O receptor PPAR γ , quando ativado, aumenta a sensibilidade à insulina nas células periféricas, abaixando a glicemia (LEHMANN et al., 1995; CAMPBELL, 2005).

A RSG é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal após administração por via oral, atingindo a concentração máxima (C_{max}) em apenas 1 hora, com biodisponibilidade de aproximadamente 99%. A RSG possui uma forte ligação às proteínas plasmáticas (99%) e é principalmente eliminada por metabolismo hepático, via CYP-450, isoforma 2C8. Os dois principais metabólitos da RSG são a *p*-hidroxi rosiglitazona (*p*-OH-R) e a *N*-desmetil rosiglitazona (*N*-Dm-R) (Figura 1). Os metabólitos produzidos são menos ativos que o fármaco. Devido ao extenso metabolismo da RSG, o fármaco inalterado não é encontrado na urina (BALDWIN CLARKE e CHENERY, 1999; COX et al., 2000).

Figura 1. RSG e seus principais metabólitos (*N*-Dm-R e *p*-OH-R).

A PGZ também é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal após administração por via oral, atingindo a $C_{\max}$ em apenas 1,5 horas, com biodisponibilidade de aproximadamente 83% (OWENS, 2002). A PGZ é extensivamente metabolizada no fígado humano através de reações de oxidação mediadas pelo CYP-450, principalmente pela isoforma 2C8. A literatura reporta a formação de quatro metabólitos primários (M-I, M-II, M-IV e M-V) e dois secundários (M-III e M-VI), sendo que o M-III (ceto-pioglitazona) é um produto do M-IV (hidroxi-pioglitazona). Os principais metabólitos encontrados no soro humano são o M-III e M-IV (Figura 2), sendo ambos farmacologicamente ativos, com potência anti-hiperglicemiante de aproximadamente 40-60% em relação à PGZ em humanos (SHEN et al., 2003; MUSCHLER et al., 2009).

Figura 2. PGZ e seus principais metabólitos (M-IV - hidroxi-pioglitazona e M-III - ceto-pioglitazona).

Apesar da alta eficácia na ação antidiabética, os TZD's possuem mecanismos de toxicidade que necessitam ser elucidados, através da realização de estudos de toxicidade e também de disposição cinética e metabolismo. Para isso, é necessário dispor de métodos analíticos capazes de quantificar os fármacos e seus metabólitos em matrizes biológicas, com seletividade e detectabilidade adequadas. Na Tabela 1 encontram-se os principais métodos bioanalíticos, recentemente publicados (2006 – 2011), para a determinação dos fármacos pertencentes à classe das TZD's, incluindo a troglitazona, que apesar de retirada do mercado devido à toxicidade em células hepáticas, é alvo de estudos no tratamento do câncer. Outros potenciais fármacos que estão em fase de estudos também foram incluídos: a lobeglitazona, a netoglitazona e a rivoglitazona (SIMÕES, CALIXTO e BONATO, 2011).

Tabela 1. Métodos bioanalíticos para análise das TZD's em matrizes biológicas

Fármaco	Técnica	Matriz	Extração	Linearidade	Obs.	Ref.
Troglitazona	UHPLC-MS-MS	Plasma (ratos)	LLE	1–2500 ng mL ⁻¹	ESI (modo negativo)	NEW et al., 2007
RSG	HPLC-MS-MS	Plasma (humano)	PPT	1–1000 ng mL ⁻¹		HE et al., 2007
RSG	HPLC-MS-MS	Plasma (humano)	LLE	5-800 ng mL ⁻¹	Análise simultânea glibenclamida	SENGUPTA et al., 2008
RSG	HPLC-MS-MS	Plasma (humano)	SLE	1–500 ng mL ⁻¹	Análise simultânea do metabólito N-Dm-R	O'MAILLE et al., 2008
RSG	HPLC-FD	Plasma (humano)	LLE	3 – 1000 ng mL ⁻¹		YU et al., 2008
RSG	HPLC-UV	Plasma (ratos)	LLE	25-2500 ng mL ⁻¹	Análise simultânea do cilostazol e do deidro cilostazol	VARANASI et al., 2008
RSG	HPLC-MS-MS	Plasma (humano)	PPT	1–500 (RSG) 1–150 (N-Dm-R) 1–25 ng mL ⁻¹ (p-OH-R)	Análise simultânea dos principais metabólitos (N-Dm-R e p-OH-R)	KIM et al., 2009
RSG	HPLC-UV CE-UV	Urina e plasma (humano)	HF-LPME	1–500 ng mL ⁻¹ (HPLC) 5-500 ng mL ⁻¹ (CE)		AZZAM et al., 2010
RSG	HPLC-FD	Plasma e líquido amniótico (ovelhas)	LLE	2,5 – 250 ng mL ⁻¹		BAZARGAN et al., 2011
RSG	HPLC-MS-MS	Plasma (cachorros)	PPT	1 – 1000 ng mL ⁻¹		FRAZIER et al., 2011
PGZ	HPLC-UV	Plasma (humano)	SPE	50–2000 ng mL ⁻¹		SRIPALAKIT, NEAMHOM, SARAPHANCH OTIWITTHAYA, 2006

CONTINUAÇÃO TABELA 1

PGZ	HPLC-UV	Plasma (humano)	SPE	50 – 2000 ng mL ⁻¹		SRIPA LAKIT et al., 2007
PGZ/RSG	HPLC-MS-MS	Plasma (macaco)	PPT	2 – 1000 ng mL ⁻¹	Análise simultânea dos seguintes fármacos antidiabéticos : repaglinida, metformina, glipizida, glibenclamida, nateglinida.	WANG e MIKSA, 2007
PGZ	HPLC-UV	Plasma (humano)	LLE	25-1500 ng mL ⁻¹	Extração simultânea de 96 amostras	SOURI, JALALIZA DEH, SAREMI, 2008
PGZ	HPLC-UV	Plasma (rato)	PPT	625–20000 ng mL ⁻¹	Avaliação da influência da quercetina na biodisponibilidade da PGZ	UMATHE et al., 2008
PGZ	HPLC-UV	Plasma (rato)	LLE	25-2500 ng mL ⁻¹	Análise simultânea de glimepirida	LAKSHMI, RAJESH, SHARMA, 2009
PGZ	HPLC-UV	Urina e plasma (humano)	HF-LPME	2,5–250 ng mL ⁻¹		TAHMASEBI, YAMINI, SALEH, 2009
PGZ	HPLC-UV	Soro (porcos)	LLE	1 – 5000 ng mL ⁻¹	Análise simultânea de felodipina	PALEM et al., 2011
PGZ	HPLC-UV	Plasma (humano)		55-2000 ng mL ⁻¹		ALIM et al., 2010
PGZ	HPLC-UV	Plasma (humano)	PPT	50-2000 ng mL ⁻¹		ISLAMBUL CHILAR, VALIZA DEH e ZAKERI-MILANI, 2010
PGZ	HPLC-MS-MS	Plasma (ratos)	LLE	10–10000 ng mL ⁻¹	Análise simultânea de olmesartan	SENGU PTA et al., 2010
PGZ	HPLC-MS-MS	Plasma (cavalos)	LLE	1 – 200 ng mL ⁻¹	Farmacocinética em cavalos	WEARN et al., 2010
PGZ	HPLC-UV	Soro (humano)	PPT	5000 – 50000 ng mL ⁻¹	Análise simultânea de gliquidona, rosuvastatina e sinvastatina	SAEED et al., 2010
PGZ/RSG	HPLC-MS-MS	Plasma (humano)	SPE	0,005 – 5 ng mL ⁻¹	Análise simultânea de 31 fármacos	YAMA NE et al., 2011

CONTINUAÇÃO TABELA 1

PGZ/ RSG	HPLC- MS-MS	Plasma (humano)	LLE	1 – 500 ng mL ⁻¹	Análise simultânea de 11 fármacos antidiabéticos	HESS, MUSSHOFF, MADEA, 2011
PGZ	HPLC- UV	Plasma (ratos)	SPE	50 – 8000 ng mL ⁻¹	Análise simultânea de glimepirida	MUSMA DE et al., 2011
Lobeglitazona	HPLC- MS-MS	Plasma (rato)	PPT	50 – 10000 ng mL ⁻¹		LEE et al., 2009
Netoglitazona	HPLC- FD	Plasma (cachorro)	PPT	5–2000 ng mL ⁻¹		SUN et al., 2006
Netoglitazona	HPLC - FD	Plasma (rato)	LLE	2–2000 ng mL ⁻¹	Análise simultânea de 96 amostras	SUN et al., 2009
Rivoglitazona	LC-MS- MS	Plasma (humano)	SPE	0,5 – 1000 ng mL ⁻¹		ROHATAGI et al., 2008

CE-UV: eletroforese capilar com detecção UV

ESI: ionização por eletronebulização

HF-LPME: microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca

HPLC-FD: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por fluorescência

HPLC-MS-MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas

HPLC-UV: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por absorção no ultravioleta

LLE: extração líquido-líquido

PPT: precipitação de proteína

SLE: extração com fase líquida suportada em membrana

SPE: extração em fase sólida

UHPLC-MS-MS: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro de massas

1.3 Técnicas de preparação de amostras

Enquanto que a instrumentação analítica passou por um forte avanço nas últimas décadas, menor atenção foi despendida às técnicas de preparação de amostras. O foco estava na separação do analito e na detecção, apesar da etapa de preparo de amostras ser considerada crítica. Esse cenário tem sido alterado nos últimos anos, com a introdução de novas técnicas de preparação de amostras, com ênfase especial em técnicas de microextração (LEE et al., 2008).

A etapa de preparação das amostras normalmente é imprescindível em matrizes complexas, como amostras biológicas, tais como plasma, soro, sangue total, homogeneizado de tecidos, saliva ou urina. Os objetivos dessa etapa são:

isolar e concentrar os analitos de interesse, eliminar previamente parte dos componentes devido à complexidade da matriz e manter os analitos em um meio compatível com o instrumento utilizado na etapa de quantificação (DE OLIVEIRA et al., 2008).

As técnicas mais comumente empregadas para a extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são a extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE) e extração em fase sólida (*Solid-Phase Extraction*, SPE). Essas técnicas de extração são laboriosas, demoradas, consomem altas quantidades de solventes orgânicos (riscos ao ambiente e ao analista), requerem quantidades significativas de amostras (em comparação a outras técnicas miniaturizadas) e envolvem um custo adicional para o descarte dos resíduos químicos gerados (SARAFRAZ-YAZDI e AMIRHASSAN, 2010).

A partir da década de 90, a tendência na área de preparação de amostras passou a ser: i) miniaturização das técnicas de extração, ii) utilização de menores quantidades de amostras, iii) maior seletividade na extração, iv) potencial de automação ou utilização de métodos *on line*, v) uso de quantidade mínima ou nenhuma de solventes orgânicos (química verde) e, vi) redução nas etapas de preparação das amostras (DE OLIVEIRA et al., 2008; SARAFRAZ-YAZDI e AMIRHASSAN, 2010).

A microextração em fase sólida (*Solid-Phase Microextraction*, SPME) foi introduzida por Pawliszyn e seu grupo (1990) e representou um avanço na área de preparação de amostras (ARTHUR e PAWLISZYN, 1990). É uma técnica inovadora e livre do consumo de solventes orgânicos (pelo menos quando a análise é feita por cromatografia gasosa) e, com isso, ganhou popularidade, além de ser comercialmente aceita. É uma técnica que envolve a amostragem, o *clean-up* e a pré-concentração em uma única etapa, ocorrendo através da distribuição dos analitos entre a fase extratora e a matriz. O dispositivo básico de SPME consiste de um tubo capilar de sílica fundida, com uma das extremidades recoberta com polímeros sorventes ou sólidos adsorventes, com espessuras de 7 a 100 µm. Quanto maior for a afinidade do analito pela fase extratora, maior será a quantidade extraída, por isso, geralmente o primeiro parâmetro a ser otimizado é o tipo de fibra (QUEIROZ e LANÇAS, 2005; DE OLIVEIRA et al., 2008).

A extração pode se dar de maneira direta ou indireta. Na extração direta, a fibra é mergulhada diretamente na amostra que é submetida à agitação. Esse tipo de extração é apropriado para solutos não voláteis. A extração indireta (*headspace*) é empregada para analitos voláteis, já que a fibra não entra em contato direto com a solução, e geralmente requer o aquecimento da amostra. A vantagem do *headspace* para análise de fármacos em amostras biológicas é que não ocorre a interação das proteínas presentes na matriz com a fibra (QUEIROZ e LANÇAS, 2005; DE OLIVEIRA et al., 2008).

A SPME apresenta simplicidade, rapidez, facilidade na automação, podendo ser acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), à cromatografia gasosa e à eletroforese capilar (*Capillary Electrophoresis*, CE). Também pode ser aplicada em amplas faixas de concentração, além de ser portátil (possibilidade de amostragens em campo). Essa técnica é empregada em diferentes matrizes, podendo ser utilizada em análises ambientais, biológicas, clínicas, farmacêuticas, entre outras. A principal limitação da SPME é a baixa recuperação. Além disso, as fibras de extração geralmente são caras. Outras desvantagens são a baixa durabilidade (principalmente perante os principais solventes orgânicos componentes das fases móveis em análises por HPLC, tais como metanol e acetonitrila) e o efeito memória (*carry over*), o que requer maiores cuidados na etapa de dessorção do analito (DE OLIVEIRA et al., 2008; LEE et al., 2008; SARAFRAZ-YAZDI e AMIRHASSAN, 2010). A microextração em fase líquida (*Liquid-Phase Microextraction*, LPME) pode ser considerada um formato da LLE, caracterizada pelo baixo consumo de solventes orgânicos. A LPME basicamente pode ser dividida em três categorias: i) microextração em gota suspensa (*Single-Drop Microextraction*, SDME), ii) microextração líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME) e, iii) microextração em fase líquida com membrana cilíndrica oca (*Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction*, HF-LPME) (SARAFRAZ-YAZDI e AMIRHASSAN, 2010).

A LPME foi introduzida em 1996, em um modo denominado SDME, no qual a extração ocorre em uma gota de solvente orgânico aderida na ponta da agulha de uma seringa. Essa gota é imersa na amostra aquosa e os analitos são extraídos de acordo com o princípio de difusão passiva. Finalizada a extração, o solvente

orgânico contendo os analitos extraídos é aspirado pela seringa e injetado diretamente no GC (*Gas Chromatography*, GC). Para análise por HPLC e CE, o solvente orgânico é evaporado a secura e o resíduo é dissolvido em um solvente apropriado. Esse sistema também pode ser realizado em três fases, no qual os analitos ionizáveis em suas formas neutras são extraídos para uma fina camada de solvente orgânico e, desse solvente orgânico, passam para uma solução aquosa presente no interior da seringa. O pH dessa solução aquosa é selecionado de tal forma a promover a máxima ionização do analito, evitando o seu retorno para o solvente orgânico. Além de não apresentar robustez adequada, a SDME tem uma desvantagem adicional quando empregada em amostras biológicas, já que essas matrizes podem emulsificar uma grande quantidade de solventes orgânicos, comprometendo a gota suspensa durante a extração (RASMUSSEN e PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2005).

A DLLME foi recentemente introduzida por Rezaee et al. (2006) como uma técnica alternativa que requer microlitros do solvente extrator e alguns mililitros do solvente dispersante. Por causa do volume de solvente dispersante usado, alguns autores não consideram a DLLME como uma técnica de microextração (REZAEI, YAMINI e FARAJI, 2010).

Nessa técnica, uma solução turva é formada pela injeção brusca da mistura do solvente extrator e dispersante diretamente na amostra aquosa, a qual contém os analitos de interesse. Os analitos hidrofóbicos são pré-concentrados no solvente extrator, que foi disperso na amostra com o auxílio do solvente dispersante. Após centrifugação, o solvente extrator é recuperado e a determinação dos analitos pode ser conduzida empregando técnicas analíticas convencionais (SARAFRAZ-YAZDI e AMIRHASSAN, 2010).

Na DLLME, o solvente dispersante possui um papel fundamental na extração, pois auxilia o solvente extrator a formar gotículas na amostra, representando aproximadamente 97-99% do volume total da mistura de extração. Devido a esse contato entre as gotículas e o analito, a DLLME acelera o processo de transferência de massas da fase aquosa para a fase orgânica, aumentando a eficiência e diminuindo o tempo da extração. Por possuírem uma baixa toxicidade e um baixo custo, a acetona, metanol, etanol e acetonitrila geralmente são usados

como solventes dispersantes, e normalmente, solventes orgânicos clorados, altamente tóxicos, são usados como solventes extratores. A principal desvantagem da DLLME é a falta de seletividade (SARAFRAZ-YAZDI e AMIRHASSAN, 2010).

Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (1999) introduziram uma nova modalidade da LPME, denominada HF-LPME, que se mostrou mais robusta que a SDME, mantendo suas vantagens de poder de pré-concentração, *clean-up* e baixo consumo de solventes orgânicos. O sistema desenvolvido constava de uma membrana cilíndrica oca, porosa e hidrofóbica suportada por duas microseringas (Figura 3).

Figura 3. Princípio da microextração em fase líquida (LPME).

A membrana (polipropileno) era inicialmente mergulhada em um solvente orgânico imiscível em água para que ele pudesse ser impregnado nos poros. Em seguida, o lúmen da membrana era preenchido com microlitros do mesmo solvente para atuar como fase aceptora, com auxílio de uma das microseringas. Depois disso, o dispositivo era introduzido na amostra para a extração dos analitos de interesse. Nesse dispositivo, a fase aceptora não entra em contato direto com a matriz aquosa (fase doadora), permitindo a aplicação de agitação constante durante a extração. Depois da extração, a fase aceptora era recolhida com a outra microseringa e submetida à análise.

Essa técnica foi empregada no desenvolvimento desse trabalho e, portanto, será discutida mais detalhadamente.

1.3.1 Microextração em fase líquida com membranas cilíndricas ocas (HF-LPME)

A HF-LPME pode ser considerada uma evolução dos métodos de microextração com solventes. A membrana capilar porosa e hidrofóbica, geralmente constituída de polipropileno, possui diâmetro interno de 600 μm , parede com espessura de 200 μm e poros de 0,2 μm . O baixo custo de cada unidade de extração possibilita o seu uso uma única vez, evitando o efeito *carry over*, normalmente observado em outras técnicas de microextração, como a SPME. A HF-LPME pode ser utilizada em dois modos: duas ou três fases. A melhor configuração é definida de acordo com as características do analito. O sistema em três fases é preferido para fármacos ionizáveis com $\log P$ maiores que 1,5, enquanto que, para fármacos não ionizáveis e altamente apolares, recomenda-se o sistema de duas fases (DE OLIVEIRA et al., 2008; LEE et al., 2008).

No sistema de duas fases, o analito é extraído da amostra aquosa (fase doadora) para o solvente orgânico imiscível em água, imobilizado nos poros da membrana; esse solvente também é colocado no lúmen da membrana e atua como fase aceptora. No sistema em duas fases, a fase aceptora pode ser analisada diretamente por GC ou o solvente pode ser evaporado à secura e o resíduo obtido dissolvido em uma solução aquosa para análise por CE ou HPLC (SARAFRAZ-YAZDI e AMIRHASSAN, 2010).

No sistema de três fases, o analito é extraído de uma amostra aquosa (fase doadora) através do solvente orgânico imiscível em água, imobilizado nos poros da membrana, passando para uma solução aquosa (fase aceptora), presente no lúmen da membrana. A fase orgânica atua como uma barreira entre as fases aceptora e doadora (ambas aquosas), impedindo o contato entre elas. A extração em três fases é empregada para analitos ionizáveis, com caráter ácido ou básico. Considerando analitos com caráter básico, o pH da fase doadora deve ser ajustado para a faixa alcalina, mantendo o analito na forma não dissociada e proporcionando assim, uma maior afinidade pela fase orgânica. Nessa situação, a fase aceptora é ácida. Sendo

assim, as moléculas que passam para a fase aceptora são protonadas e impedidas de retornar para o solvente orgânico. Por causa disso, as recuperações obtidas nesse modo geralmente são maiores que na extração em duas fases. Para analitos ácidos, a fase doadora deve ser ácida e a fase aceptora deve ser alcalina (RASMUSSEN e PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2008).

O consumo de solventes orgânicos na HF-LPME é baixo, geralmente 15-20 µL de solvente orgânico é impregnado na membrana de polipropileno. As principais características dos solventes orgânicos a serem empregados na HF-LPME, são: i) devem ser imiscíveis em água para que não se dissolvam na amostra ou na fase aceptora (sistema em três fases), ii) baixa volatilidade para evitar a perda durante a extração e, iii) compatibilidade com a membrana e solubilidade frente ao analito de interesse. Os principais solventes orgânicos utilizados, tanto nos sistemas em duas como em três fases, são o 1-octanol e o tolueno (RASMUSSEN e PEDERSEN-BJERGAARD, 2004; PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2005; DE OLIVEIRA et al., 2008).

A ligação dos fármacos às proteínas constitui uma das dificuldades encontradas na determinação de analitos em amostras biológicas, sendo que o ajuste do pH da amostra e uma simples diluição podem diminuir essa interação fármaco-proteína. No caso de fármacos altamente ligados a proteínas, umas das principais alternativas para minimizar esse efeito é a adição de metanol (5-50%, v/v) para supressão dessa interação (HO, PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2002). Essa limitação da técnica (diminuição da recuperação para analitos altamente ligados a proteínas) pode por outro lado, ser empregada para determinar a fração ligada e a fração livre de um fármaco em amostras biológicas, comparando a recuperação entre amostras biológicas e em matrizes livres de proteínas (LEE et al., 2008).

Em ambos os modos de extração, uma alta pré-concentração pode ser obtida, principalmente para analitos que possuem um alto coeficiente de partição, pois eles são transferidos por difusão passiva de um volume relativamente alto de amostra (1-5 mL) para microlitros de fase aceptora (5-50 µL) (RASMUSSEN e PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). O fator de enriquecimento pode ser estabelecido pela equação abaixo:

$$E = \frac{V_d \times R}{V_a \times 100}$$

Na qual (E) corresponde ao fator de enriquecimento, (V_d) ao volume da fase doadora, (R) é a recuperação do analito e (V_a) o volume da fase aceptora. Por exemplo, caso o volume da fase doadora seja 1 mL, o volume da fase aceptora 50 µL e a recuperação for de 50%, o fator de enriquecimento será 10.

As situações discutidas acima são aplicadas a analitos que possuem um alto coeficiente de partição. No caso de analitos polares, que são pouco solúveis em solventes orgânicos e possuem pequenas diferenças de solubilidade em soluções aquosas ácidas ou básicas, a extração por HF-LPME torna-se complicada. Essa desvantagem na extração de analitos polares contribui para que a HF-LPME seja uma técnica seletiva (SARAFRAZ-YAZDI e AMIRHASSAN, 2010).

Para a extração de analitos polares recomenda-se o emprego de um carreador com caráter relativamente hidrofóbico, mas que possua solubilidade aceitável na fase doadora aquosa. Por exemplo, para a extração de morfina e practolol pode-se empregar o ácido octanóico como carreador (HO et al., 2003). O carreador forma um par iônico com o analito de interesse e o complexo formado é transferido para o solvente orgânico impregnado na membrana de polipropileno. Na região entre a fase orgânica e a fase aceptora, os analitos são liberados do par iônico na solução aceptora (RASMUSSEN e PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

O sistema originalmente descrito por Pedersen-Bjergard e Rasmussen (1999) possuía uma configuração em “U” e os autores empregaram microseringas para suportar a membrana e introduzir e retirar a fase aceptora. Posteriormente, outros formatos foram desenvolvidos. Em um deles, a membrana tem o formato de haste com o fundo fechado (RASMUSSEN e PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Mais recentemente, Magalhães e Bonato (2008) desenvolveram um novo sistema na configuração em “U”, na qual a membrana de extração é suportada por duas ponteiros, através das quais, a fase aceptora é introduzida e retirada (Figura 4). Esse sistema foi empregado no desenvolvimento dos métodos aqui relatados, usando um sistema de agitação que permite a agitação de até 36 amostras simultaneamente.

Figura 4. Fotos ilustrativas contendo (A) membrana de polipropileno, (B) unidade de HF-LPME (membrana de polipropileno, duas ponteiros empregadas na eletroforese em gel e uma tampa empregada em eletroforese capilar) e (C) unidade de HF-LPME inserida no tubo de extração (Adaptado de Magalhães e Bonato, 2008).

Além das características inerentes ao analito (coeficientes de ionização e partição) e do tipo de solvente orgânico empregado, alguns outros parâmetros devem ser considerados durante o desenvolvimento do método, tais como: ajuste do pH da amostra, força iônica, tipo e dimensões da membrana hidrofóbica, tempo e temperatura da extração, composição da solução aceptora e agitação do sistema (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Além da redução do consumo de solventes orgânicos, da simplicidade e do baixo custo das unidades de extração, a HF-LPME proporciona recuperações relativamente altas, altos fatores de enriquecimento, excelente *clean-up* e rapidez na extração (15-45 minutos).

A HF-LPME é amplamente empregada em análises: i) ambientais (solos, água do mar e do rio, sedimentos marinhos, etc), ii) biológicas (plasma, urina, fração microssomal de fígado de ratos, saliva, etc), iii) alimentícias (vinho, vegetais, leite), entre outras (PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2008; LEE et al., 2008).

A Tabela 1 mostra que a HF-LPME já foi empregada para análise de TZD's em matrizes biológicas. Azzam et al. (2010) descrevem a utilização da HF-LPME para determinação de RSG em plasma e urina, utilizando a CE e a HPLC-UV como técnicas de separação. Há também o trabalho descrito por Tahmasebi et al. (2009), no qual a HF-LPME foi empregada para a determinação de PGZ em urina e plasma por LC-UV, corroborando a recente aplicação da HF-LPME em matrizes biológicas. Entretanto, esses métodos permitem apenas a análise dos fármacos e não dos metabólitos.

1.4 Técnicas analíticas empregadas na análise de fármacos em matrizes biológicas

1.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A HPLC pode ser considerada uma técnica bastante madura e ela está presente em praticamente todos os laboratórios que trabalham com a análise de fármacos em matrizes biológicas. Os desenvolvimentos mais significativos da técnica nas duas últimas décadas foram direcionados para a introdução de novas fases estacionárias, de sistemas de detecção mais seletivos e com possibilidade de fornecimento de informação estrutural da amostra e de sistemas que permitem a análise mais rápida e com bom desempenho cromatográfico.

O desenvolvimento de novas fases estacionárias tem por finalidade melhorar as suas estabilidades química e térmica, diminuir a acidez dos grupos silanóis residuais e obter análises mais rápidas. Sendo assim, as fases estacionárias mais modernas baseadas em sílica podem ser divididas em dois grupos: fases com maior estabilidade química e térmica e com menor porcentagem de grupos silanóis residuais e fases compatíveis com análises mais rápidas, como aquelas baseadas em sílica monolítica ou superficialmente porosa.

Dentre as fases desenvolvidas com o objetivo de obter maior estabilidade e redução na quantidade de grupos silanóis residuais, destacam-se as fases preparadas com sílica híbrida. Este material híbrido poroso difere da sílica

convencional por apresentar grupos metilas incorporado na matriz inorgânica, conferindo maior estabilidade química.

Outra fase estacionária bastante interessante e utilizada na análise de compostos básicos é a chamada fase estacionária com grupamento polar embutido. Estes grupos polares (carbamatos, amida ou uréia) são inseridos na cadeia n-alquila da sílica modificada, geralmente após o terceiro grupo metileno ligado ao átomo de silício do organossilano imobilizado (MALDANER, COLLINS e JARDIM, 2010).

Dentre as fases estacionárias recentemente introduzidas, destacam-se também as fases estacionárias quirais. Os modos de eluição utilizados na cromatografia clássica, modo normal e modo reverso, além do modo polar orgânico, podem ser aplicados na resolução de enantiômeros. A escolha dependerá, principalmente, da solubilidade do composto de interesse (compostos apolares necessitam de fases móveis apolares), do detector empregado (detectores eletroquímicos precisam de fases móveis aquosas) e da estabilidade da fase estacionária com os solventes usados (BONATO, JABOR e GAITANI, 2005).

As fases estacionárias quirais são em sua maioria constituídas de um suporte de sílica ou sílica-aminopropil aos quais os seletores quirais são incorporados ou quimicamente ligados. Essas fases estacionárias quirais são derivadas, principalmente, de polissacarídeos, antibióticos e proteínas (HAGINAKA, 2002). A diversidade de seletores quirais permite o desenvolvimento de metodologias analíticas para compostos de alta diversidade estrutural e justifica a quantidade de fases estacionárias quirais comercializadas, atualmente mais que 200 (SANCHO e MINGUILLÓN, 2009).

Uma das alternativas para a redução dos tempos de análise é a diminuição no comprimento das colunas. Entretanto, isso faz com que haja perda de resolução e desempenho cromatográfico. Para evitar isso, a redução do comprimento da coluna é acompanhada pela redução do tamanho das partículas da fase estacionária (partículas menores que 2 μm). Para separações um pouco mais complexas que exigem o emprego de colunas maiores ou quando se deseja aumentar a vazão da fase móvel para reduzir o tempo de análise, a utilização de fases estacionárias com partículas menores que 2 μm tem como inconveniente as pressões elevadas que são geradas. Com os recentes desenvolvimentos nos sistemas de bombas e demais

acessórios (cromatografia líquida de ultra-eficiência), é possível trabalhar hoje com pressões de até 15000 psi e tornar a análise até 20 vezes mais rápida (MALDANDER e JARDIM, 2009).

O acoplamento da espectrometria de massas à cromatografia líquida de alta eficiência (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) fornece uma série de vantagens, tais como: alta seletividade e detectabilidade, tempos de análise reduzidos e alta capacidade de processamento (MA e ZHU, 2009; YODIM e SAUNDERS, 2010). Sendo assim, a detecção, elucidação estrutural e quantificação de metabólitos em estudos de metabolismo *in vitro*, vem sendo feita cada vez mais empregando essa técnica. A introdução do efluente da coluna no espectrômetro de massas é feita empregando, principalmente, as fontes de ionização por eletronebulização (*Electrospray Ionization*, ESI) e ionização química a pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI). Os analisadores mais frequentemente utilizados em LC-MS são: *ion trap*, *time off flight* e quadrupolo (ARDREY, 2003). O analisador quadrupolo, utilizado no formato de três analisadores em série (triplo-quadruplo), é o mais empregado para análises quantitativas na área farmacêutica, devido à maior seletividade e detectabilidade. Nesse caso, as análises são feitas no modo monitoramento de reações selecionadas (*Single Reaction Monitoring*, SRM), ou seja, o primeiro quadrupolo seleciona um íon de m/z adequado, no segundo quadrupolo esse íon é fragmentado e o terceiro quadrupolo seleciona um dos íons formados (YODIM e SAUNDERS, 2010).

1.4.2 Eletroforese Capilar

A CE é uma técnica analítica complementar à HPLC e vem sendo cada vez mais utilizada em razão da alta eficiência na separação, tempo de análise curto, baixo custo e possibilidade de acoplamento com diferentes detectores (absorção no UV, eletroquímicos, por fluorescência induzida a *laser* e espectrômetro de massas) (NAYLOR, BENSON e TOMLINSON, 1996).

Na CE, a separação acontece em capilares de sílica fundida com diâmetros internos que variam de 25 a 100 μm , preenchidos por uma solução de eletrólitos. Os

principais componentes de um sistema CE são: uma fonte de alta tensão, um detector conectado ao sistema de aquisição de dados e um sistema de introdução de amostra. A Figura 5 mostra um desenho esquemático de um sistema CE. Para realizar as análises, o capilar é primeiramente preenchido com uma solução tampão, também chamada de eletrólito de análise (*Back Ground Electrolyte*, BGE). Na sequência, a amostra é introduzida na extremidade do capilar oposta ao detector. Então, as duas extremidades do capilar são introduzidas em reservatórios contendo os eletrodos e o eletrólito. Um dos eletrodos é conectado a um cabo que conduz a tensão aplicada, enquanto que o outro é conectado a um cabo terra. Devido à aplicação da tensão através do capilar, os íons migram ao longo deste em direção ao eletrodo apropriado e passam pelo detector. A migração dessas espécies carregadas deve-se aos movimentos eletroforéticos e eletrosmóticos (ALTRIA, 1996).

Figura 5. Desenho esquemático dos principais componentes do sistema de eletroforese capilar

A aplicação de um potencial elétrico através do capilar causa movimentos eletroforéticos e eletrosmóticos. O movimento eletroforético ou mobilidade eletroforética é inerente à espécie iônica. Portanto, cátions migram em direção ao cátodo (eletrodo negativo) e ânions migram em direção ao ânodo (eletrodo positivo). Quanto maior a carga e menor o tamanho do íon, maior será a mobilidade. Por outro

lado, o movimento eletroosmótico origina-se no ânodo, segue em direção ao cátodo e bombeia eficientemente os íons do soluto ao longo do capilar em direção ao detector. Esse movimento, denominado fluxo eletroosmótico (*Electroosmotic Flow*, EOF), ocorre em razão da ionização dos grupos silanóis ácidos (SiOH) presentes na parede interna do capilar de sílica quando em contato com a solução tampão. Em pH baixo, o movimento eletroosmótico da solução diminui devido à diminuição da ionização dos grupamentos silanóis na parede do capilar; em pHs muito baixos esse movimento pode ser nulo e assim a migração dos analitos se dará apenas devido à migração eletroforética (ALTRIA, 1996). O aumento do pH do BGE aumenta o EOF e ele impulsiona tanto espécies carregadas (íons), inclusive ânions, como espécies neutras.

A equação abaixo mostra a relação carga/massa com a mobilidade eletroforética (μ_{ef}) do analito, na qual, (q) corresponde ao número de cargas, (η) a viscosidade do meio e, (r) ao raio do íon:

$$\mu_{ef} = \left(\frac{q}{6\pi\eta r} \right)$$

A velocidade eletroforética (V_{ef}) de cada íon é dada pela equação abaixo, onde (E) corresponde a tensão aplicada ($V.cm^{-1}$). Portanto, quanto maior a tensão aplicada, maior será a velocidade de migração do íon no interior do capilar (ALTRIA, 1996):

$$V_{ef} = \mu_{ef} E$$

A mobilidade eletroosmótica (μ_{eo}) é dada pela equação abaixo e está associada com a viscosidade do meio (η) e o potencial zeta (ζ), que é relacionado com a carga da superfície interna do capilar.

$$\mu_{eo} = \left(\frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \right)$$

A velocidade eletroosmótica (V_{eo}) é diretamente proporcional à mobilidade eletroosmótica da solução. A equação a seguir apresenta a relação entre a velocidade eletroosmótica e a tensão aplicada:

$$V_{eo} = \mu_{eof} E$$

Uma vantagem apresentada pelo EOF é o perfil plano de seu fluxo que resulta em eficiências bem superiores às observadas com o fluxo hidrodinâmico, característico de HPLC, que possui formato parabólico (ALTRIA, 1996).

A CE pode ser utilizada em vários modos de separação, dentre eles: eletroforese capilar em solução livre, eletrocromatografia micelar, eletroforese capilarem gel, focalização isoeletrica capilar e isotacoforese capilar (TAVARES, 1997). A separação de enantiômeros por CE é realizada, na maioria das vezes, pela adição de seletos quirais na solução de eletrólitos, resultando na formação de diastereoisômeros transitórios. A diferença de estabilidade das interações dos enantiômeros com o seletor quiral ocasiona diferentes mobilidades tempo-dependentes e proporciona a separação (BLANCO e VALVERDE, 2003).

As maiores desvantagens da CE são o limite de detecção relativamente alto, como consequência do limitado volume de amostra analisado e da restrição do caminho óptico para a detecção (quando detecção por absorção no UV é empregada) e menor precisão da injeção quando comparada aos métodos cromatográficos. Para minimizar essas limitações instrumentais, várias medidas podem ser adotadas como: uso de sistemas de detecção mais sensíveis (detectores eletroquímicos, por fluorescência induzida a *laser* e espectrômetro de massas), procedimentos de extração das matrizes que concentram o analito (LLE, SPE, HF-LPME ou SPME) e procedimentos específicos que permitam injetar um maior volume de amostra sem que haja alargamento das bandas, com consequente perda

de eficiência (BONATO, JABOR e GAITANI, 2005; MORAES, TAVARES e PEREIRA, 2010).

A estratégia mais simples para pré-concentrar os analitos é o empilhamento (*stacking*) mediado por força iônica. Nesta estratégia, um grande volume de amostra, preparada em um solvente com condutividade elétrica menor que a do eletrólito de análise, é introduzido hidrostáticamente no capilar. Após a aplicação da tensão, esta região de baixa condutividade experimentará um campo elétrico (E) maior que a região do eletrólito de análise. Os íons presentes na amostra movem-se mais rapidamente na região de baixa condutividade; quando eles alcançam a interface entre a banda da amostra (alto campo elétrico local) e a banda do eletrólito de análise (baixo campo elétrico local), são desacelerados, causando uma compactação da banda da amostra. A partir daí o campo elétrico torna-se homogêneo e a amostra é separada segundo os princípios convencionais da CE. O mecanismo de *stacking* ocorre tanto para as espécies carregadas positivamente quanto para as espécies carregadas negativamente (MORAES, TAVARES e PEREIRA, 2010).

1.5 Referências Bibliográficas

ALIM, M.; NAWAZ, R.; SHAHID, M.; ASI, M.R.; IQBAL, T.; ANWAR, F. HPLC method for the determination of pioglitazone in human plasma and its application to pharmacokinetic study. **Asian Journal of Chemistry**, Ghaziabad, v. 22, n. 1, p. 213-221, 2010.

ALTRIA, K.D. Fundamentals of capillary electrophoresis theory. In: _____. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications**. Totowa: Humana Press Inc., 1996. Cap. 1, p. 3-13.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alerta SNVS/Anvisa/Nuvig/Gfarm nº 04, de 29 de Setembro de 2010. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/posuso/farmacovigilancia>. Acesso em 1 de dezembro de 2011.

ARDREY, R.E. Liquid Chromatography. In: _____. **Liquid Chromatography – mass spectrometry: an introduction**. Chichester: Wiley, 2003. Cap. 3, p. 7-31.

ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of Human Liver Microsomes in *In Vitro* Metabolism of Drugs—A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 160, n.6, p. 1699–1722, 2010.

AZZAM, K.M.A.; MAKAHLEAH, A.; SAAD, B.; MANSOR, S.M. Hollow fiber liquid-phase microextraction for the determination of trace amounts of rosiglitazone (anti-diabetic drug) in biological fluids using capillary electrophoresis and high performance liquid chromatographic methods. **Journal Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 23, p. 3654-3659, 2010.

BALDWIN, S.J.; CLARKE, S.E.; CHENERY, R.J. Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the *in vitro* metabolism of rosiglitazone. **Journal of Clinical Pharmacology**, Thousand Oaks, v. 48, n.3, p. 424-432, 1999.

BLANCO, M.; VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, p. 428-439, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diabetes Mellitus / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006. 64 p. il. – (Cadernos de Atenção Básica, n. 16) (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

BAZARGAN, M.; DAVEYA, A.K.; MUHLHAUSLER, B.S.; MORRISON, J.L.; McMILLENA, I. C.; FOSTER, D.J.R. Simple HPLC method for determination of rosiglitazone in sheep plasma and amniotic fluid and its application in a pregnant sheep model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 360–365, 2011.

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.; DE GAITANI, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2005.

BRANDON, E.F.A.; RAAP, C.D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLEN, J.H.M. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 189, n. 3, p. 233-246, 2003.

CAMPBELL, I.W. The clinical significance of PPAR gamma agonism. **Current Molecular Medicine**, Sharjah, v. 5, n. 3, p. 349-363, 2005.

CAMPO, V.L.; BERNARDES, L.S.; CARVALHO, I. Stereoselectivity in Drug Metabolism: Molecular Mechanisms and Analytical Methods. **Current Drug Metabolism**, Sharjah, v. 10, n.2, p. 188-205, 2009.

COX, P.J.; RYAN, D.A.; HOLLIS, F.J.; HARRIS, A.M.; MILLER, A.K.; VOUSDEN, M.; COWLEY, H. Absorption, disposition, and metabolism of rosiglitazone, a potent thiazolidinedione insulin sensitizer, in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 28, n.7, p. 772-780, 2000.

DE OLIVEIRA, A.R.M.; MAGALHÃES, I.R.S.; DE SANTANA, F.J.M.; BONATO, P.S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n.3, p. 627-644, 2008.

FRAZIER, S.A.; McKEMIE, D.S.; GUERRERO, T.A.; SKORUPSKI, K.A.; RODRIGUES, C.O.J. Evaluation of an extractionless high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for detection and quantitation of rosiglitazone in canine plasma. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 72, n. 2, p. 263-270, 2011.

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

HAKURA, A.; SUZUKI, S.; SATOH, T. Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. **Mutation Research-genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 438, n. 1, p. 29-36, 1999.

HE, J.; HU, Y.F.; DUAN, L.F.; TAN, Z.R.; WANG, L.S.; WANG, D., ZHANG, W.; LI, Z.; LIU, J.; TU, J.H.; YAO, Y.M.; ZHOU, H.H. Sensitive and selective liquid chromatography–mass spectrometry method for the quantification of rosiglitazone in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 580-585, 2007.

HESS, C.; MUSSHOFF, F.; MADEA, B. Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography–mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 400, n. 1, p.33–41, 2011.

HO, T.S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions. **Analyst**, Cambridge, v. 127, n. 5, p. 608-613, 2002.

HO, T.S.; HALVORSEN, T.G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 998, n. 1-2, p. 61-72, 2003.

INZUCCHI, S.E. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes. Scientific Review. **Jama-Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 287, n. 3, p. 360-372, 2010.

ISLAMBULCHILAR, Z.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Rapid HPLC determination of pioglitazone in human plasma by protein precipitation and its application to pharmacokinetic studies, **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 63, n. 3, p. 876-881, 2010.

JAMALI, B.; BJØRNSDOTTIR, I.; NORDFANG, O.; HANSEN, S.H. Investigation of racemisation of the enantiomers of glitazone drug compounds at different pH using chiral HPLC and chiral CE. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 46, p. 82-87, 2008.

JIA, L.; LIU, X. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): *in vitro* experiments. **Current Drug Metabolism**, Sharjah, v. 8, n. 8, p. 822-829, 2007.

KIM, K.B.; LEE, D.J.; YEO, C.W.; SHIN, J.G.; BAE, S.K. Simultaneous quantification of rosiglitazone and its major metabolites, N-desmethyl and p-hydroxy rosiglitazone in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Application to a pharmacokinetic study. **Journal Chromatography B**, Amsterdam, v. 877, n. 20-21, p. 1951-1956, 2009.

LAKSHMI, K.S.; RAJESH, T.; SHARMA, S. Determination of pioglitazone and glimepiride in pharmaceutical formulations and rat plasma by RP-LC. **International Journal of PharmTech Research**, Mumbai, v. 1, n. 3, p. 496-499, 2009.

LEHMANN, J.M.; MOORE, L.B.; SIMTH-OLIVER, T.A.; WILKISON, W.O.; WILLSON, T.M.; KLIEWER, S.A. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, n. 22, p. 12953-12956, 1995.

LEE, J.; LEE, H.K.; RASMUSSEN, K.E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 624, n. 2, p. 253-268, 2008.

LEE, J.H.; WOO, Y.; HWANG, I.; KIM, C.; KIM, D.; SHIM, C.; CHUNG, S. Quantification of CKD-501, lobeglitazone, in rat plasma using a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method and its applications to pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 50, n. 5, p. 872-877, 2009.

LORENZATI, B.; ZUCCO, C.; MIGLIETTA, S.; LAMBERTI, F.; BRUNO, G. Oral hypoglycemic drugs: pathophysiological basis of their mechanism of action. **Pharmaceuticals**, Mumbai, v. 3, n. 9, p.3005-3020, 2010.

MA, S.; ZHU, M. Recent advances in applications of liquid chromatography–tandem massspectrometry to the analysis of reactive drug metabolites, **Chemico-Biological Interactions**, East Park Shannon, v. 179, n. 1, p. 25–37, 2009.

MAGALHÃES, I.R.S.; BONATO, P.S. Enantioselective determination of chloroquine and its *n*-dealkylated metabolites in plasma using liquid-liquid-phase microextraction and LC-MS. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 31, n. 16-17, p. 3106-3116, 2008.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MALDANER, L.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 113, n. 3-4, p. 173–215, 1983.

Ministério da Saúde (2007). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=29793&janela=1. Acesso em 1 de dezembro de 2011.

MORAES, M.L., TAVARES, M.F.M., PEREIRA, E.A. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar. Parte 2. manipulação da velocidade da fase dispersa/secundária. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 466-470, 2010.

MUSCHLER, E.; LAL, J.; JATTER, A.; RATTAY, A.; ZANGER, U.; ZADOYAN, G.; FUHR, U.; KIRCHHEINER, J. The role of human CYP2C8 and CYP2C9 variants in pioglitazone metabolism *in vitro*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Malden, v.105, n. 6, p. 374–379, 2009.

MUSMADE, P.B.; TALOLE, K.B.; DESHPANDE, P.B.; KARTHIK, A.; PATHAK, S.M.; PANDEY, S.; UDUPA, N. Novel liquid chromatographic method for simultaneous estimation of pioglitazone and glimepiride in rat plasma by solid phase extraction:

Application to preclinical pharmacokinetic studies. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, Stuttgart, v. 61, n.1, p. 23-31, 2011.

NAYLOR, S.; BENSON, L.M.; TOMLINSON, A.J. Application of capillary electrophoresis and related techniques to drug metabolism studies. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 735, n. 1-2, p. 415-438, 1996.

NEW, L.S.; SAHA, S.; ONG, M.M.; BOELSTERLI, U.A.; CHAN, E.C. Pharmacokinetic study of intraperitoneally administered troglitazone in mice using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Malden, v. 21, n. 6, p. 982-988, 2007.

NISSEN, S.E.; WOLSKI, K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 356, n. 24, p. 2457-2472, 2007.

NISSEN, S.E.; WOLSKI, K. An Updated Meta-analysis of Risk for Myocardial Infarction and Cardiovascular Mortality. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 170, n. 14, p. 1191-1201, 2010.

O'MAILLE, G.; PAI, S.M.; TAO, X.; DOUGLAS JR, G.T.; JENKINS, R.G. An improved LC-ESI-MS-MS method for simultaneous quantitation of rosiglitazone and N-desmethyl rosiglitazone in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 934-939, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2004. World Health Organization, International Diabetes Federation. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/actionnow/en/DANbooklet.pdf>. Acesso em 23 de janeiro de 2011.

PALEM, C.R.; GANNU, R.; YAMSANI, S.K.; YAMSANI, V.V.; YAMSANI, M.R. Development of a high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of pioglitazone and felodipine in pig serum: application to pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, Malden, v. 25, n. 8, p. 952-958, 2011.

PARKS, D.J.; TOMKINSON, N.C.O.; VILLENEUVE, M.S.; BLANCHARD, S.G.; WILLSON, T.M. Differential activity of rosiglitazone enantiomers at PPAR γ . **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 8, n. 24, p. 3657-3658, 1998.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Liquid-Liquid-Liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 71, p. 2650-2656, 1999.

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

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

PELKONEN, O.; KALTIALA, E.H.; LARMI, T.K.I.; KÄRKI, N.T. Cytochrome P-450-linked monooxygenase system and drug-induced spectral interactions in human-liver microsomes. **Chemico-Biological Interactions**, East Park Shannon, v. 9, n. 3, p. 205-216, 1974.

QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida "no tubo" e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.R.; AGHAEE, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid-microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1116, n. 1-2, p. 1-9, 2006.

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

ROHATAGI, H.; CARROTHERS, T.J.; JIN, J.; JUSKO, W.J.; KHARITON, T.; WALKER, J.; TRUITT, K.; SALAZAR, D.E. Model-based development of a PPAR gamma agonist, rivoglitazone, to aid dose selection and optimize clinical trial designs. **Journal of Clinical Pharmacology**. Thousand Oaks, v. 48, n. 12, p. 1420-1429, 2008.

SAEED, A.M.; NAJMA, S.; ZEESHAN, M.A.; HINA, S. High-performance liquid chromatographic analysis of pioglitazone, gliquidone, rosuvastatin and simvastatin in formulations and human serum. **Chinese Journal of Chemistry**, Malden, v. 28, n. 10, p. 1998-2002, 2010.

SANCHO, R.; MINGUILLÓN, C. The chromatographic separation of enantiomers through nanoscale design. **Chemical Society Reviews**, London, v. 38, n. 3, p. 797-805, 2009.

SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRHASSAN, A. Liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 1-14, 2010.

SENGUPTA, P.; DAS, A.; CHATTERJEE, B.; BHAUMIK, U.; GHOSH, A.; BOSE, A.; PAL, T. K. Simultaneous quantitation of rosiglitazone and glibenclamide in human plasma by LC-MS/MS; method development and validation. **Research Journal of Biotechnology**, Indore, 414-418, 2008.

SHEN, Z.; REED, J.R.; CREIGHTON, M.; LIU, D.Q.; TANG, Y.S.; HORA, D.F.; FEENEY, W.; SZEWCZYK, J.; BAKHTIAR, R.; FRANKLIN, R.B.; VINCENT, H. Identification of novel metabolites of pioglitazone in rat and dog. **Xenobiotica**, London, v. 33, n. 5, p. 499-509, 2003.

SIMÕES, R.A.; CALIXTO, L.A.; BONATO, P.S. Bioanalytical methods for the analysis of hypoglycemic drugs and their main metabolites. **Current Pharmaceutical Analysis**, Sharjah, v. 7, p. 141-159, 2011.

SOURI, E.; JALALIZADEH, H.; SAREMI, S. Development and validation of a simple and rapid HPLC method for determination of pioglitazone in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatographic Science**, Niles, v. 46, n. 9, p. 809-12, 2008.

SRIPALAKIT, P.; NEAMHOM, P.; SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A. High-performance liquid chromatographic method for the determination of pioglitazone in human plasma using ultraviolet detection and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 843, n. 2, p. 164-169, 2006.

SRIPALAKIT, P.; MAPHANTA, S.; NEAMHOM, P.; SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A. comparative study on the bioequivalence of two formulations of pioglitazone tablet in healthy thai male volunteers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, London, v. 33, n. 12, p. 1362-1368, 2007.

SUN, N.; LU, G.; LIN, M.; FAN, G.; WU, Y. Quantitative determination of MCC-555, a novel insulin sensitizer in beagle dog plasma by high-performance liquid

chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 835, n. 1-2, p. 35–39, 2006.

SUN, N.; LU, G.; LIN, M.; FAN, G.; WU, Y. High-throughput quantification of a novel thiazolidinedione MCC-555 in rat plasma by ultra-fast liquid chromatography and its application in pharmacokinetic studies. **Talanta**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 506–512, 2009.

TAHMASEBI, E.; YAMINI, Y.; SALEH, A. Extraction of trace amounts of pioglitazone as an anti-diabetic drug with hollow fiber liquid phase microextraction and determination by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection in biological fluids. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 877, n. 20-21, p. 1923–1929, 2009.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TRACY, T.S. Enzyme Kinetics. In: _____. **Metabolism in drug design and development**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2008. Cap. 4, p. 89-112.

UMATHE, S.N.; DIXIT, P.V.; KUMAR, V.; BANSOD, K.U.; WANJARI, M.M. Quercetin pretreatment increases the bioavailability of pioglitazone in rats: Involvement of CYP3A inhibition. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 75, n. 8, p. 1670–1676, 2008

VARANASI, V. S.; VEERARAGHAVAN, S.; POTHARAJU, S.; THAPPALI, R. S.; RAGHAVAN, R.; VAKKALANKA, V. S. Validated high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of rosiglitazone, cilostazol, and 3,4-dehydro-cilostazol in rat plasma and its application to pharmacokinetics. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, Stuttgart, v. 58, n. 6, p. 288-96, 2008.

WANG, M.; MIKSA, I. Multi-component plasma quantitation of anti-hyperglycemic pharmaceutical compounds using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 856, n. 1-2, p. 318-327, 2007.

WEARN, J.M.G.; CRISMAN, M.V.; DAVIS, J.L.; GEOR, R.J.; HODGSON, D.R.; SUAGEE, J.K.; ASHRAF-KHORASSANI, M.; MCCUTCHEON, L.J. Pharmacokinetics of pioglitazone after multiple oral dose administration in horses. **Journal of**

Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Malden, v. 34, n. 3, p. 252–258, 2010.

YAMANE, N.; TOZUKA, Z.; KUSAMA, M.; MAEDA, K.; IKEDA, T.; SUGIYAMA, Y. Clinical Relevance of liquid chromatography tandem mass spectrometry as an analytical method in microdose clinical studies. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 28, n. 8, p. 1963–1972, 2011.

YOUDIM, K.A.; SAUNDERS, K.C. A review of LC–MS techniques and high-throughput approaches used to investigate drug metabolism by cytochrome P450s. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 878, n. 17-18, p. 1326–1336, 2010.

YU, J.; MA, K.; QI, J.; JIN, G.; WANG, Y.; FANG, S.; LI, G. Bioequivalence and comparison of pharmacokinetic properties of 4-mg tablet formulations of rosiglitazone Hydrochloride and rosiglitazone maleate: A single-dose, randomized, open-label, two-period crossover study in healthy adult male chinese volunteers. **Clinical Therapeutics**, Bridgewater, v. 30, n. 12, 2008.

ZHANG, Z.Y.; KAMINSKY, L.S. Determination of metabolic rates and enzyme kinetics. In: _____. **Metabolism in drug design and development**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2008. Cap. 13, p. 411-446.

CAPÍTULO 2

Objetivos Gerais

1. Desenvolver e validar metodologias analíticas para análise da rosiglitazona (RSG), pioglitazona (PGZ) e dos principais metabólitos desses fármacos em fração microssomal de fígado de ratos, visando a aplicação em estudos de metabolismo *in vitro*. Para desenvolvimento desses métodos, a microextração em fase líquida com membranas cilíndricas ocas (HF-LPME) foi selecionada como técnica de preparação das amostras.
2. Estudar a racemização da RSG e de seus metabólitos em diferentes condições, com o objetivo de avaliar a possibilidade de realização de um estudo de metabolismo *in vitro* de forma enantiosseletiva.

CAPÍTULO 3

Análise da rosiglitazona e seus principais metabólitos por HF-LPME e HPLC-UV, com aplicação em estudos de metabolismo *in vitro* empregando fração microssomal de fígado de ratos

3.1. Introdução

Como já informado no Capítulo 1, a RSG é extensivamente metabolizada pela enzima CYP2C8 a dois principais metabólitos, *p*-OH-R e *N*-Dm-R. A identificação desses metabólitos foi feita pela primeira vez por Baldwin, Clarke e Chenery (1999) que descreveram as principais vias metabólicas para a RSG. Posteriormente, Yamazaki et al. (2000) comparam a troglitazona quanto a inibição de isoformas do CYP-450 em relação à PGZ e RSG. Cox et al. (2000) identificaram 13 metabólitos da RSG em urina, fezes e plasma de humanos, empregando a espectrometria de massas com interface por eletronebulização. Sahi et al. (2002) comparam a inibição e a indução de isoformas do CYP-450 mediadas pela RSG, troglitazona e PGZ com o uso de culturas primárias de hepatócitos (indução) e microsomas humanos (inibição).

Embora o uso de microsomas de fígado humano seja a melhor opção para estudos de metabolismo *in vitro*, a utilização de microsomas obtidos a partir de outras espécies, tais como ratos, também é interessante devido ao baixo custo e à simplicidade na obtenção deste material. A utilização de microsomas de fígado de ratos pode ser útil para comparar os perfis metabólicos e para produzir metabólitos para o desenvolvimento de métodos bioanalíticos, por exemplo (JIA e LIU 2007; LIPSCOMB e POET, 2008).

Além disso, o conteúdo de CYP2C (família de enzimas de metabolizam a RSG) em fígados humanos é cerca de 55 pmol de proteína por mg de microsomas enquanto que em fígado de ratos, o valor é de aproximadamente 638 pmol de proteína por mg de microsomas (LIN, 1998). Sendo assim, o emprego de microsomas de fígados de ratos pode produzir maiores quantidades de metabólitos para poderem ser utilizados em outros estudos. O metabolismo *in vitro* da RSG empregando microsomas de fígado de ratos ainda não foi descrito na literatura

A realização desses estudos requer métodos analíticos sensíveis e seletivos capazes de quantificar e identificar os metabólitos formados no meio de incubação. LC-UV, LC-MS e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (*Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS-MS) são alternativas analíticas nos estudos de metabolismo *in vitro*. Em estudos de perfil metabólico, além da quantificação é necessário elucidar as estruturas dos

metabólitos formados, portanto LC-MS e LC-MS-MS tornam-se as alternativas mais apropriadas para estabelecer a rota metabólica responsável pela depuração do composto de interesse (WEI e ZHU,2008).

A quantificação dos metabólitos em matrizes biológicas é na maioria das vezes uma etapa desafiadora, principalmente quando se emprega a detecção UV que não é tão seletiva. O estudo de metabolismo por LC-UV é possível quando há a disponibilidade dos padrões de referência dos metabólitos a serem investigados e as moléculas em questão apresentam uma boa absorvidade no UV. Empecilhos associados a essa técnica estão relacionados à baixa concentração dos metabólitos formados e interferência de componentes endógenos presentes na matriz biológica. Portanto, a etapa analítica de estudos de metabolismo *in vitro* requer também procedimentos adequados de preparação da amostra, visando à concentração do analito e a eliminação de interferentes endógenos (WEI e ZHU,2008; ZHANG e KAMINSKI, 2008). As principais técnicas de preparação de amostras empregadas para essa finalidade são a LLE e SPE. Entretanto, técnicas de microextração também vêm sendo empregadas, particularmente a HF-LPME.

Apesar de vários métodos estarem descritos na literatura para análise da RSG em matrizes biológicas (Tabela 1), apenas um permite a quantificação simultânea do fármaco e seus principais metabólitos (*N*-Dm-R e *p*-OH-R), nesse caso, usando a espectrometria de massas para detecção (KIM et al., 2009). Quanto a procedimentos de preparação da amostra, apenas o método descrito por Azzam et al. (2010) faz uso da HF-LPME, no entanto, esse método permite apenas a análise de RSG. Nos demais métodos bioanalíticos relatados na literatura científica, as principais técnicas empregadas para a preparação das amostras foram a LLE e a SPE (Tabela 1).

3.2 Objetivo Específico

Desenvolver e validar um método por cromatografia líquida com detecção UV, empregando a HF-LPME como técnica de preparação das amostras e avaliar a metabolização da RSG pela fração microssomal de fígado de ratos.

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Análise cromatográfica

a. Solventes (grau cromatográfico)

- 1) Metanol: Fischer Scientific (Fair Lawn, NJ, EUA)
- 2) Acetonitrila: Tedia (Fairfield, OH, EUA)
- 3) Água ultrapurificada: Millipore Milli-Q-system (Milford, MA, EUA)

b. Reagentes (grau p.a.)

- 1) Ácido acético glacial: J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA)
- 2) Acetato de amônio: Labsynth (Diadema, SP, Brasil)

c. Soluções-padrão

Os padrões do fármaco maleato de RSG (pureza 98%) e dos metabólitos *N*-Dm-R (pureza 98%) e *p*-OH-R (pureza 98%) foram adquiridos da Toronto Research Chemical Inc. (North York, ON, Canadá).

As soluções-padrão utilizadas foram preparadas em metanol, na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, e armazenadas à temperatura de -20°C e protegidas da ação da luz. Nessas condições de armazenamento, foi verificado que essas soluções são estáveis por mais de dois meses.

d. Coluna cromatográfica

Os experimentos foram conduzidos em uma coluna X-Terra MS C-18 (100 mm x 3,9 mm, I.D., partículas de $3,5 \mu\text{m}$, Waters, Milford, MA, EUA) protegida por uma coluna guarda do mesmo material (20 mm x 3,9 mm, I.D., partículas de $3,5 \mu\text{m}$, Waters, Milford, MA, EUA).

e. Equipamentos

O equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), empregado na avaliação das condições cromatográficas, é composto de:

- 1) 2 Bombas modelo LC-10AD VP
- 2) Injetor Rheodyne (Cotati, CA, EUA) modelo 7725i com amostrador de 20 µL
- 3) Forno modelo CTO 10AS VP
- 4) Detector modelo SPD-M 10A VP
- 5) Controladora modelo SCL-10A VP
- 6) Sistema de aquisição de dados com software Class VP versão 6.14 SP2

f. Condições cromatográficas

A separação do fármaco e seus metabólitos foi avaliada em modo reverso. Quando a solução aquosa empregada na composição da fase móvel continha sais, elas eram filtradas em membrana Millipore de 0,45 µm. Em seguida, o solvente orgânico era adicionado à solução aquosa e a fase móvel era degaseificada por 15 min, empregando um aparelho de ultrassom acoplado a um sistema de vácuo. Este procedimento visou à eliminação de gases e partículas que pudessem interferir na análise.

As condições alteradas na avaliação da separação foram: porcentagem de solvente orgânico, pH, vazão da fase móvel e temperatura. Os parâmetros avaliados na escolha da melhor condição cromatográfica foram resolução (R_s) e eficiência (número de pratos, N), calculadas segundo as equações abaixo (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997):

$$R_s = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}}$$

Na qual (t_{R2}) é o tempo de retenção do analito mais retido e (t_{R1}) do menos retido. (w_{b1}) e (w_{b2}) são as respectivas larguras das bases dos picos, calculadas pelo método da tangente.

$$N = 16 \frac{t_R^2}{(w_b)^2}$$

Na qual (t_R) é o tempo de retenção do analito avaliado e (w_b) é a largura da base do pico, calculada pelo método da tangente.

Para caracterizar os outros metabólitos formados durante o processo de metabolismo, foi empregado um equipamento de cromatografia líquida similar ao descrito no item 3.3.1 (e), acoplado a um espectrômetro de massas. O sistema de detecção por MS utilizado foi o Quattro LC triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com uma interface ESI, operada no modo positivo. As análises foram executadas no modo SRM. As temperaturas da fonte e de desolvatação foram mantidas em 130°C e 250°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de secagem e de nebulização e o argônio como gás de colisão. A aquisição e tratamento de dados foram executados através do programa MassLynx, versão 3.5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

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

a. Membrana capilar de polipropileno Accurel PP Q 3/2 com diâmetro interno de 600 µm, parede com espessura de 200 µm e poros de 0,2 µm (Membrana, Wuppertal, Alemanha)

b. Solventes orgânicos

Os solventes orgânicos (grau p.a.) utilizados na impregnação da membrana de polipropileno foram:

- 1) Éter *n*-hexílico: Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA)
- 2) 1-octanol: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)

- 3) Acetato de dodecila: Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha)

c. Reagentes analíticos (grau p.a.)

- 1) Fosfato monossódico monoidratado: Merck (Darmstadt, Alemanha)
- 2) Fosfato dissódico diidratado: Merck (Darmstadt, Alemanha)
- 3) Hidróxido de sódio: Spectrum (New Brunswick, NJ, EUA)
- 4) Ácido perclórico: Nuclear (São Paulo, SP, Brasil)
- 5) Ácido trifluoracético (TFA): Acros Organics (Morris Plains, NJ, EUA)
- 6) Ácido acético glacial: Cinética (Jandira, SP, Brasil)
- 7) Ácido clorídrico: Mallinckrodt (Xalostoc, Estado do México, México)
- 8) Cloreto de sódio: Merck (Darmstadt, Alemanha)

d. Soluções-padrão

Conforme item 3.3.1 (c), porém preparadas na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol.

e. Equipamentos e outros materiais usados na HF-LPME

- 1) Balança analítica Ohaus, modelo adventurer (Pine Brook, NJ, EUA):
- 2) Potenciômetro Thermo Orion 420 A+ (Waltham, MA, EUA)
- 3) Agitador Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, SP, Brasil)
- 4) Purificador de água Milli-Q plus Millipore/Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA)
- 5) Agitador Vibrax VXR basic IKA - Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Alemanha)

f. Técnica de extração por HF-LPME

Em razão da grande quantidade de variáveis no procedimento de extração, a otimização do método foi feita empregando planejamento experimental. Durante a otimização do método, $25 \mu\text{L}$ das soluções-padrão do fármaco e metabólitos ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram transferidos para tubos de vidro para extração. Em seguida, o solvente foi evaporado à secura sob fluxo de ar comprimido e os resíduos foram dissolvidos em 1 mL de tampão fosfato de sódio 1 mol L^{-1} , pH 7,4. Posteriormente, adicionou-se

400 μL de ácido perclórico 6% (v/v). Esse ácido foi adicionado para mimetizar o que acontece durante o estudo de metabolismo, no qual o ácido tem a função de cessar a atividade de enzimas biológicas presentes na matriz e encerrar o metabolismo. O volume final foi completado para 4,0 mL com água. Amostras contendo a fração microsomal e reagentes necessários para executar o metabolismo *in vitro* também foram extraídas para verificar a presença de interferentes endógenos que pudessem interferir nas condições cromatográficas pré-estabelecidas.

Para cada extração, uma membrana de polipropileno de 15 cm de comprimento foi fixada nas duas extremidades de ponteiras plásticas (MAGALHÃES e BONATO, 2008) e imersa durante 15 segundos em um solvente orgânico para sua deposição nos poros. Em seguida, o excesso de solvente foi retirado em banho ultrassônico durante 15 segundos. Após impregnação, o volume de 50 μL da fase aceptora foi introduzido no interior da membrana capilar, utilizando-se uma microseringa. A membrana capilar foi então imersa na fase doadora presente no tubo extrator, e então se iniciava a extração por agitação. Após a extração, a fase aceptora foi retirada da membrana usando outra microseringa e transferida para um tubo cônico de vidro. Uma alíquota de 25 μL foi misturada com 25 μL de fase móvel, e posteriormente uma alíquota de 20 μL foi injetada no sistema cromatográfico.

Inicialmente, foram realizados nove experimentos com o intuito de determinar a melhor combinação entre três solventes orgânicos (acetato de dodecila, éter *n*-hexílico, 1-octanol), usados para impregnar a membrana, e três soluções ácidas (ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹, ácido perclórico 0,01 mol L⁻¹ e ácido trifluoracético 0,1 mol L⁻¹), usadas como fase aceptora.

Em seguida foi realizado um planejamento fatorial fracionário com 5 fatores: pH da fase doadora (para manter o pH 8,0, 200 μL de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ foi adicionado após a adição do ácido perclórico 6%), concentração de ácido da fase aceptora, agitação da amostra, adição de sal na fase doadora e tempo de extração, conforme apresentado na Tabela 2. Os resultados foram avaliados pelo software estatístico Minitab 14.0 (State College, PA, EUA).

Tabela 2. Fatores estudados no planejamento fatorial fracionário na otimização da HF-LPME

Fatores	Nível (-)	Nível (+)
Tempo de extração (min)	20	40
Concentração de ácido na fase aceptora (mol L^{-1})	0,002	0,05
Velocidade da agitação (rpm)	1000	1750
NaCl (% m/v)	0	10
pH da fase doadora	6	8

3.3.3 Validação da metodologia analítica

O método foi validado conforme recomendações de guias oficiais da FDA (2001) e ANVISA (2003) pela avaliação dos seguintes parâmetros: recuperação, linearidade, limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, seletividade, robustez e estabilidade (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

Na determinação da recuperação do procedimento de extração, alíquotas de 1 mL do meio de incubação (720 μL de tampão fosfato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4, 250 μL de solução tampão tris-HCl 50 mmol L^{-1} / KCl $0,154 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 e 30 μL de fração microssomal contendo 1 mg mL^{-1} de proteínas) foram fortificadas com 25 μL de soluções-padrão de RSG, *N*-Dm-R e *p*-OH-R nas concentrações de 6, 80 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, resultando em concentrações finais no meio de incubação de 150, 2000 e 5000 ng mL^{-1} , respectivamente. Posteriormente, adicionou-se 400 μL de ácido perclórico 6% (v/v) com o intuito de cessar a atividade de enzimas presentes na matriz e 200 μL de NaOH 2 mol L^{-1} para manter o pH 8,0. O volume final foi completado para 4,0 mL com água ultrapura e, em seguida, efetuou-se o procedimento de extração e análise. Para o cálculo da recuperação, as áreas obtidas para essas amostras extraídas foram comparadas com áreas obtidas pela injeção direta de soluções do fármaco e metabólitos preparadas na fase móvel nas mesmas concentrações.

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curvas analíticas (em triplicata) obtidas pela fortificação de 1 mL do meio de incubação com 25 μL de soluções-padrão de RSG, *N*-Dm-R e *p*-OH-R nas concentrações de 2, 20,

40, 80, 160 e 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$, resultando em concentrações no meio de incubação de 50, 500, 1000, 2000, 4000 e 6000 ng mL^{-1} .

A detectabilidade do método foi avaliada pela determinação do LQ, definido como a menor concentração dos analitos que pode ser determinada com exatidão e precisão inferiores a 20% (FDA, 2001; ANVISA, 2003). Para esta determinação, 5 alíquotas de 1 mL do meio de incubação foram fortificadas com 50 ng mL^{-1} de cada analito e analisadas com base em uma curva analítica preparada simultaneamente.

A precisão e exatidão intradia foram determinadas pela análise de quintuplicatas de amostras do meio de incubação fortificadas com RSG e seus metabólitos nas concentrações de 150, 2000 e 5000 ng mL^{-1} . A precisão e exatidão interdias ($n = 3$) foram avaliadas analisando essas mesmas amostras por três dias. Os resultados obtidos foram expressos como coeficiente de variação percentual (CV%) para a determinação da precisão e como erro relativo (E%) para a determinação da exatidão do método.

A seletividade do método foi avaliada pela análise do meio de incubação na ausência do substrato (RSG) e seus principais produtos (*N*-Dm-R e *p*-OH-R), na ausência da fração microssomal, responsável pelo metabolismo do substrato, e na ausência do cofator (NADPH).

A estabilidade ($n = 3$) nas condições de incubação (37°C, 1 hora) e à temperatura ambiente (25°C por 12 horas) foi avaliada empregando o meio de incubação fortificado com 150 ng mL^{-1} e 50000 ng mL^{-1} da RSG e metabólitos.

A robustez do método foi avaliada por meio do emprego de um planejamento experimental. O planejamento selecionado foi um fatorial fracionário de dois níveis 2^{4-1} (8 experimentos) e foi realizado pela seleção de 4 fatores: composição da fase móvel (água:acetonitrila), quantidade de ácido acético adicionado (% *v/v*), vazão (mL min^{-1}) e temperatura do forno (°C). Os fatores e níveis avaliados são mostrados na Tabela 3. As respostas avaliadas foram: resolução, tempo de corrida e áreas dos picos. As respostas obtidas foram processadas pelo programa estatístico Minitab® 14 (State College, PA, EUA) para avaliação da significância dos efeitos.

Tabela 3. Fatores estudados no planejamento fatorial fracionário na avaliação da robustez do método

Fatores	Valor otimizado	Nível (-)	Nível (+)
Vazão (mL min ⁻¹)	1,00	0,98	1,02
Adição de ácido acético (% v/v)	0,50	0,45	0,55
H ₂ O:acetonitrila (v/v)	85:15	87:13	83:17
Temperatura do forno (°C)	22	20	24

3.3.4 Metabolismo *in vitro*

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) (anexo 1).

a. Reagentes grau p.a.

- 1) Fosfato de β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADP): Sigma (St. Louis, MO, EUA)
- 2) Glicose-6-fosfato: Sigma (St. Louis, MO, EUA)
- 3) Glicose-6-fosfato desidrogenase: Sigma (St. Louis, MO, EUA)
- 4) Cloreto de potássio: Nuclear (São Paulo, SP, Brasil)
- 5) Ácido clorídrico: Chemco (Campinas, SP, Brasil)
- 6) Glicerol: J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA)
- 7) Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA): Carlo Erba (Milão, Itália)
- 8) KIT Gold Analisa (Belo Horizonte, MG, Brasil) contendo padrão de soro-albumina bovina e solução de biureto.
- 9) Hepes: Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha)

b. Soluções-padrão

Conforme item 3.3.1 (c), porém preparadas na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol.

c. Animais

Os animais (seis ratos Wistar machos, pesando de 180 a 200 g) foram obtidos do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, classificação SPF (*Specific Patogen Free*).

d. Equipamentos

- 1) Balança analítica Ohaus, modelo adventurer (Pine Brook, NJ, EUA):
- 2) Homogeneizador do tipo *Potter* Marconi modelo MA 181 (São Paulo, SP, Brasil)
- 3) Centrífuga Hitachi, modelo HIMAC CF 15D2 (Tóquio, Japão)
- 4) Ultra-centrífuga Beckman, modelo XL-70 (Fullerton, CA, EUA)
- 5) Espectrofotômetro SPECTRONIC 20 GENESYS Spectronic instruments (Nova Iorque, NY, EUA)
- 6) Banho-maria com agitação Marconi, modelo MA093 (São Paulo, SP, Brasil)

e. 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 do animal), 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, adicionou-se o volume de aproximadamente 20 mL de tampão tris-HCl 50 mmol L⁻¹/ KCl 0,154 mol L⁻¹, pH 7,4 e triturou-se o material em homogeneizador tipo *Potter* em 3 ciclos, sendo que cada ciclo compreende 3 triturações de um minuto com velocidade de 1000 rpm. O homogeneizado foi centrifugado (9500 rpm, 4°C, 15 minutos), o sobrenadante foi ultracentrifugado (38000 rpm, 4°C, 60 minutos) e os *pellets* obtidos foram ressuspensos em solução tampão Hepes-HCl 10 mmol L⁻¹/ KCl 0,154 mol L⁻¹/ EDTA 1 mmol L⁻¹/ 20% de glicerol (LAKE, 1987).

f. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas na fração microssomal foi determinada segundo o procedimento apresentado na Tabela 4. 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.

Tabela 4. Dosagem de proteínas totais

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

^aSoro-albumina bovina

^bSulfato de cobre pentaidratado 0,15% e tartarato de sódio e potássio 0,6% em hidróxido de sódio 0,75 mol L⁻¹

A concentração de proteínas foi calculada segundo as equações:

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

Na qual, Fc corresponde ao fator de correção, Cp concentração de proteínas do padrão, Ap absorbância do padrão, Ct concentração de proteínas do teste e At absorbância do teste.

g. Estudo de metabolismo *in vitro* (fração microssomal fígado de ratos)

Para os experimentos iniciais, utilizou-se a concentração de 10,56 µmol L⁻¹ (5000 ng mL⁻¹) de substrato. Uma alíquota de 50 µL da solução-padrão de RSG (100 µg mL⁻¹) foi transferida para um tubo de vidro. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e, em seguida, foram adicionados 250 µL da solução de incubação (*NADPH regenerating system*, NRS) contendo NADP, glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase em solução tampão tris-HCl 50 mmol L⁻¹ / KCl 0,154 mol L⁻¹, pH 7,4, resultando em concentrações no meio de incubação de 1,7 mg mL⁻¹, 7,8 mg mL⁻¹ e 1,5 unidades, respectivamente. Após 5 minutos de incubação à 37°C, a fração microssomal foi adicionada e o volume final foi completado para 1,0 mL com tampão fosfato de sódio 0,5 mol L⁻¹ pH 7,4. Depois da incubação, 400 µL de ácido perclórico 6% (v/v) foram adicionados para cessar a atividade das enzimas

presentes no meio de incubação e 200 μL de NaOH 2 mol L^{-1} foram adicionados para manter o pH 8,0, condições estabelecidas na otimização da extração. O volume final foi completado para 4,0 mL com água ultrapura e, em seguida, procedeu-se a extração por HF-LPME.

Antes de iniciar a investigação da cinética enzimática, é necessário definir a faixa linear de formação dos metabólitos em função da concentração de proteínas e do tempo de incubação. A faixa linear referente à concentração de proteínas foi avaliada no intervalo de 0,05 – 5,00 mg mL^{-1} . Após estabelecida a concentração de proteínas microssomais, um novo experimento foi conduzido para determinar o intervalo linear em relação ao tempo de incubação, entre 3 – 60 min. Como as reações mediadas pelo CYP-450 possuem velocidades baixas à moderadas quando comparadas com outras enzimas, o tempo de incubação pode ser aplicado em 60 min, e em alguns casos até mais. A metodologia analítica aplicada nos estudos de metabolismo *in vitro*, deve ser capaz de quantificar os metabólitos formados nas condições previamente estabelecidas, no entanto, o substrato deverá apresentar um decaimento de no máximo 20% em relação à sua concentração inicial de incubação (ZHANG e KAMINSKY, 2008).

Definidos os intervalos lineares para a concentração de proteínas microssomais e o tempo incubação, a determinação da constante Michaelis-Menten e da velocidade máxima V_{max} foi realizada avaliando a formação dos metabólitos *N*-Dm-R e *p*-OH-R no meio microssomal em função da concentração do substrato. As constantes foram determinadas por regressão não-linear, empregando o programa Prism 5.

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Condições cromatográficas

Alguns testes em colunas disponíveis no laboratório mostraram que a coluna X-Terra MS C-18 foi a mais adequada para a resolução da RSG e seus metabólitos. Diferentes composições de fase móvel foram avaliadas, variando-se o tipo de

solvente orgânico (metanol e acetonitrila) e a composição da fase aquosa (acetato de amônio 10 mmol L⁻¹, pH 7 e ácido acético 10 mmol L⁻¹, pH 3), com o objetivo de obter uma separação cromatográfica satisfatória (boa resolução e eficiência). A influência da vazão da fase móvel e da temperatura também foi avaliada. A melhor condição cromatográfica foi definida com uma fase móvel composta por água, acetonitrila e ácido acético (85:15:0,5, v/v/v), vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em 245 nm. A separação cromatográfica pode ser visualizada na Figura 6, enquanto que os parâmetros cromatográficos obtidos nessas condições são apresentados na Tabela 5. A RSG e seus metabólitos apresentam caráter de base fraca com pKa's de 6,8 e 6,1 para RSG, 6,0 e 6,35 para *N*-Dm-R e 5,64 e 8,89 para *p*-OH-R, respectivamente (SCIFINDER WEB), portanto, em pH 3,0, esses analitos devem estar protonados. A RSG possui log P de 2,56, enquanto seus metabólitos *N*-Dm-R e *p*-OH-R possuem log P de 2,22 e 2,51, respectivamente. Portanto, apesar da polaridade não diferir muito entre os analitos, principalmente entre RSG e *p*-OH-R, a fase estacionária usada foi seletiva o suficiente para permitir a separação. Essa separação decorre não apenas da interação dos analitos na cadeia apolar do hidrocarboneto, mas também nos grupos silanóis residuais. De acordo com Borges e Collins (2012) a mudança de tampão utilizado na coluna X Terra MS pode inverter a seletividade para analitos básicos.

Figura 6. Cromatograma referente à análise de (1) *N*-Dm-R, (2) RSG e (3) *p*-OH-R. Condições cromatográficas: Coluna X-Terra MS C-18 (100 mm × 3,9 mm, partículas de 3,5 µm), utilizando água:acetonitrila:ácido acético (85:15:0,5, v/v/v) como fase móvel, sob condições isocráticas, temperatura de 22 °C, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em 245 nm.

Tabela 5. Parâmetros cromatográficos obtidos nas condições otimizadas

Parâmetros cromatográficos	N-Dm-R	RSG	p-OH-R
Resolução (Rs)	---	4,25	1,55
Número de pratos teóricos (N)	2353	2921	3061

$t_M = 1,15$ min, definido como o primeiro distúrbio significativo da linha de base, correspondendo ao tempo de retenção de um analito não retido.

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

Conforme indicado anteriormente, a RSG e seus metabólitos apresentam caráter de base fraca, portanto, a extração por HF-LPME em três fases deve ser feita com a fase doadora alcalinizada e a fase aceptora acidificada. Sendo assim, foram selecionadas três soluções de ácidos: ácido perclórico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, ácido trifluoracético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido clorídrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Durante a realização dos testes preliminares, avaliou-se também o ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, porém as recuperações da RSG e de seus metabólitos foram baixas. Como a intenção era injetar a fase aceptora diretamente no sistema cromatográfico, optou-se por utilizar soluções mais diluídas dos ácidos para que não houvesse o risco de danificar o sistema cromatográfico, exceção feita ao ácido trifluoracético, o qual pode ser empregado como aditivo na cromatografia líquida em concentrações mais altas. Os solventes orgânicos avaliados para serem impregnados na membrana foram: 1-octanol (álcool), acetato de dodecila (éster) e éter *n*-hexílico (éter).

O solvente orgânico deve apresentar baixa solubilidade ou insolubilidade em água, prevenindo a dissolução da fase orgânica na aquosa; baixa volatilidade, evitando a perda de fase orgânica durante a extração; compatibilidade com a membrana capilar utilizada (no caso, polipropileno); fácil impregnação nos poros da membrana e solubilidade adequada para os analitos de interesse (OLIVEIRA et al., 2008). Os solventes orgânicos escolhidos para a otimização, além de possuírem características necessárias para a HF-LPME, pertencem a funções químicas diferentes, permitindo uma avaliação mais concreta de uma melhor combinação entre o solvente orgânico em conjunto com a fase aceptora.

Para a realização dos testes, foram conduzidos nove experimentos, em duplicata, combinando-se os três solventes orgânicos e as três soluções de ácidos selecionadas para constituírem a fase aceptora, e os resultados são mostrados conforme a Figura 7.

Figura 7. Avaliação da influência do solvente orgânico (acetato de dodecila (A), éter n-hexílico (B) e 1-octanol(C)) e do ácido empregado como fase aceptora (ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹, ácido trifluoracético 0,1 mol L⁻¹ e ácido perclórico 0,01 mol L⁻¹).

De acordo com os resultados mostrados no gráfico acima, o 1-octanol foi escolhido como solvente orgânico e o ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹ como fase aceptora. Apesar dessa condição não ter apresentado a maior extração para a RSG, foi a mais eficiente para o p-OH-R e uma das melhores para a N-Dm-R. Como o objetivo desse método é avaliar a formação dos metabólitos em estudos de metabolismo *in vitro*, essa combinação apresentou uma maior recuperação para os metabólitos.

O planejamento fatorial fracionário foi aplicado com o intuito de avaliar outros parâmetros que pudessem influenciar diretamente no processo de extração. Os parâmetros selecionados foram: pH fase doadora, concentração de HCl na fase aceptora, adição de NaCl, tempo de extração e velocidade (RPM) de agitação.

O planejamento experimental é interessante quando se deseja avaliar a influência de vários fatores em determinado processo, uma vez que fornece informações mais precisas da relação desses fatores entre si, além de requerer um número reduzido de análises. Um planejamento adequado permite, além do aprimoramento de processos, a redução da variabilidade dos resultados, redução do tempo de análise e dos custos envolvidos (FERREIRA et al., 2007). Como o número de fatores a serem investigados na otimização do procedimento de extração é grande, optou-se por um planejamento fracionário, o qual permite obter informações úteis através de um número reduzido de experimentos. Os resultados desse estudo são apresentados na Figura 8, em que maior a inclinação maior a influência do fator na eficiência da extração.

As condições a serem empregadas na HF-LPME foram escolhidas da seguinte forma:

- ✓ pH 8,0: foi escolhido para manter os analitos na forma não ionizada contribuindo para que eles tenham uma maior afinidade pelo solvente orgânico. O pH foi particularmente importante para a extração de *N*-Dm-R.

- ✓ Ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹: apesar da maior eficiência de extração ocorrer em 0,05 mol L⁻¹, uma concentração baixa de ácido clorídrico foi escolhida para permitir que a amostra seja injetada diretamente no sistema cromatográfico.

- ✓ Sem adição de NaCl: a adição de sal pode diminuir a solubilidade do analito na água e, conseqüentemente, aumentar a extração por causa do efeito *salting-out* (DE OLIVEIRA et al., 2008). Apesar do aumento na eficiência de extração ocasionado pela adição do sal, principalmente para o *N*-Dm-R, optou-se em não adicioná-lo visto que nos estudos de metabolismo, o meio de incubação é mais viscoso que esse meio no qual foi feita a otimização. A adição de NaCl tornaria o meio ainda mais viscoso, podendo prejudicar a extração.

- ✓ Tempo de extração de 30 min: A transferência de massa na HF-LPME é um processo tempo-dependente (RASMUSSEN e PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Portanto, o aumento do tempo de extração leva a um aumento nas recuperações até atingir um platô. Os resultados mostrados na Figura 8 indicam que tempos maiores de extração levaram à maior recuperação, principalmente dos

metabólitos. Entretanto, optou-se por utilizar um tempo intermediário de 30 minutos para não tornar a etapa de extração muito longa.

✓ Velocidade da agitação de 1750 rpm: maiores velocidades permitem alcançar mais rapidamente as condições de equilíbrio, portanto o nível mais alto foi escolhido (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Figura 8. Influência dos fatores avaliados individualmente (pH da fase doadora, concentração de ácido da fase aceptora, agitação da amostra, adição de sal na fase doadora e tempo de extração) na eficiência de extração da RSG, N-Dm-R e p-OH-R na HF-LPME.

Com base nos parâmetros avaliados, a condição otimizada para a HF-LPME foi estabelecida da seguinte forma: agitação da amostra em 1750 rpm, tempo de

extração de 30 min, ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹ como fase aceptora, 1-octanol como solvente orgânico e o pH da fase doadora ajustado para 8,0.

3.4.3 Validação da metodologia analítica

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos na avaliação da recuperação da RSG (aproximadamente 71%), *N*-Dm-R (aproximadamente 52%) e *p*-OH-R (aproximadamente 47%), com CV% inferiores a 13,6%, valores considerados adequados pelas agências reguladoras (FDA, 2001; ANVISA, 2003). Os valores de recuperação obtidos, embora não muito elevados, possibilitaram alcançar limites de quantificação suficientes para aplicar o método no estudo de metabolismo desse fármaco. Azzam et al. (2010) obtiveram uma recuperação de 42 % para a RSG, valor abaixo ao obtido nesses experimentos.

Tabela 6. Recuperação do método para a análise de RSG, *N*-Dm-R e *p*-OH-R em fração microssomal de fígado de ratos

Concentração (ng mL ⁻¹) ^a	RSG		<i>N</i> -Dm-R		<i>p</i> -OH-R	
	Recuperação (%)	CV (%) ^b	Recuperação (%)	CV (%) ^b	Recuperação (%)	CV (%) ^b
150	81,3	3,5	57,7	8,5	45,9	4,4
2000	66,8	6,3	51,8	6,9	48,6	14,3
5000	63,2	10,0	46,2	7,7	46,4	4,1
Média	70,4	13,6	51,9	11,1	47,0	3,1

a) Cada concentração foi avaliada em triplicata;

b) CV (%), coeficiente de variação expresso em porcentagem

A Tabela 7 apresenta as equações lineares e respectivos coeficientes de correlação linear (*r*) obtidos para as curvas analíticas da RSG, *N*-Dm-R e *p*-OH-R. Os valores dos coeficientes de correlação foram superiores a 0,99. Normalmente em métodos bioanalíticos, quando o intervalo de calibração é amplo, é bastante difícil obter linearidade devido à heteroscedasticidade. Para evitar isso, pode-se recorrer ao recurso de ponderação dos dados (ALMEIDA, CASTEL-BRANCO e FALCÃO, 2002). Essa situação foi observada para a RSG e seus metabólitos, portanto, o peso

$1/x^2$ foi usado para ponderar os dados. Os erros relativos em cada concentração das curvas analíticas ponderadas foram inferiores a 15%.

Na Tabela 7 também são apresentados os valores de precisão (CV, %) e exatidão (E, %) para o limite de quantificação (50 ng mL⁻¹), cujos valores foram inferiores a 20% (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

Tabela 7. Linearidade e LQ do método para a análise de RSG, *N*-Dm-R e *p*-OH-R em fração microsomal de fígado de ratos

Analitos	Equação linear	Coefficiente de correlação	Concentração analisada (ng mL ⁻¹) ^a	E (%) ^b	CV(%) ^c
RSG	$y = 163,71x + 1423,28$	0,9961	49,1	-1,8	10,7
<i>N</i>-Dm-R	$y = 137,02x + 1142,73$	0,9972	48,4	-3,2	11,9
<i>p</i>-OH-R	$y = 142,38x - 683,93$	0,9963	51,1	2,1	4,2

a) LQ, $n=5$

b) E (%), erro relativo do LQ expresso em porcentagem

c) CV (%), coeficiente de variação do LQ expresso em porcentagem

Para avaliar a precisão e exatidão intra e interdias foram utilizadas alíquotas de meio de incubação (1 mL) fortificadas com 150, 2000 e 5000 ng mL⁻¹ de cada analito. A Tabela 8 apresenta os valores de precisão (CV, %) e exatidão (E, %) intra e interdias para a RSG, *N*-Dm-R e *p*-OH-R.

Tabela 8. Precisão e exatidão do método para a análise de RSG, *N*-Dm-R e *p*-OH-R em fração microsomal de fígado de ratos

Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	RSG			N-Dm-R			p-OH-R		
	150	2000	5000	150	2000	5000	150	2000	5000
Precisão intradia									
Concentração (ng mL ⁻¹)	171,0	2076,2	5157,1	132,9	2178,3	5371,7	137,4	2109,1	5052,7
Precisão (CV, %) ^a	1,3	7,9	6,4	2,7	7,9	5,1	7,1	8,0	9,8
Exatidão (E, %) ^b	14,0	3,8	3,1	-11,4	8,9	7,4	-8,4	5,5	1,1
Precisão interdia									
Concentração (ng mL ⁻¹)	159,5	1962,5	5183,8	131,4	2116,1	5434,2	138,2	2074,9	5026,9
Precisão (CV, %) ^a	8,1	8,2	7,6	4,5	8,9	4,4	6,8	8,5	6,7
Exatidão (E, %) ^b	6,3	-1,9	3,7	-12,4	5,8	8,7	-7,9	3,8	0,5

n = número de replicatas, sendo 5 para a precisão intradia e n = número de dias, sendo 3 para a precisão interdias.

a) CV (%), coeficiente de variação expresso em porcentagem

b) E (%), erro relativo expresso em porcentagem

A seletividade do método foi avaliada através da análise cromatográfica de amostras extraídas do meio de incubação na ausência de RSG e seus principais metabólitos (*N*-Dm-R e *p*-OH-R), na ausência da fração microssomal e na ausência do cofator NADPH (solução NRS). Os cromatogramas são apresentados na Figura 9.

Figura 9. Avaliação da seletividade do método para análise de RSG, *N*-Dm-R e *p*-OH-R em fração microssomal de fígado de ratos. (A) meio de incubação na ausência de RSG e seus principais metabólitos (*N*-Dm-R e *p*-OH-R), (B) meio de incubação na ausência da fração microssomal e (C) meio de incubação na ausência da solução NRS. Condições cromatográficas: Coluna X-Terra C-18 (100 mm × 3,9 mm, partículas de 3,5 µm), utilizando água:acetonitrila:ácido acético (85:15:0,5,v/v/v) como fase móvel, à 22 °C, sob condições isocráticas, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detecção em 245 nm. O pico que aparece em 9 minutos corresponde à RSG.

A estabilidade dos compostos RSG, *N*-Dm-R e *p*-OH-R foi avaliada através da incubação das amostras por 1 hora (simulando as condições de biotransformação) e deixando as amostras na bancada por 12 horas. Os analitos mostraram-se estáveis nas condições de metabolismo (erro relativo menor que 15% em relação ao grupo controle), no entanto, no estudo de estabilidade na bancada por 12 horas, houve uma diferença acima de 15% em relação ao grupo controle, principalmente para o *p*-OH-R. Assim, um novo estudo foi conduzido deixando as amostras na bancada por apenas 2 horas; nessa condição todos os analitos se

mostraram estáveis. Em função dos resultados obtidos no estudo de estabilidade, as amostras submetidas ao estudo de metabolismo foram extraídas imediatamente após a incubação.

Na determinação da robustez do método, avaliada através de um planejamento experimental, a significância dos efeitos foi representada por um gráfico de Pareto. Nesse gráfico, o tamanho de cada efeito foi representado por barras. O valor t-crítico para α de 0,05 foi representado por uma linha vertical. Os efeitos para os quais as barras são menores que o valor de t-crítico são considerados como efeitos não significativos, ou seja, são efeitos que pequenas variações não afetam a resposta do método. A Figura 10 mostra que os efeitos dos fatores como a composição da fase móvel (água:acetonitrila) e a temperatura do forno, nas faixas estudadas, foram estatisticamente significativos para as respostas consideradas (tempo de migração e resolução). Dessa maneira, esses fatores devem ser controlados durante a realização das análises.

Figura 10. Avaliação da robustez do método de análise de RSG, N-Dm-R e p-OH-R em fração microssomal de fígado de ratos, representada pelo Gráfico de Pareto. Rs1 corresponde à resolução entre os picos de N-Dm-R e RSG, enquanto que Rs2 corresponde à resolução entre RSG e p-OH-R.

3.4.4. Metabolismo *in vitro*

3.4.4.1 Determinação da cinética de formação dos principais metabólitos da RSG: *N*-Dm-R e *p*-OH-R

O método validado foi aplicado em um estudo de metabolismo *in vitro* usando a fração microssomal de fígado de ratos. A aplicação desse modelo fornece uma indicação do perfil metabólico das várias isoformas do citocromo P450 (CYP) e da UDP-glicuronosiltransferase (UGT), no entanto, não deve ser empregado para estimar a biotransformação *in vivo*, porque as CYPs e UGTs são enriquecidas na fração microssomal e não há a competição com outras enzimas (BRANDON et al., 2003).

Primeiramente, um teste foi conduzido para avaliar a estabilidade do substrato frente às condições de metabolismo. Apesar da estabilidade da RSG nas condições de incubação já ter sido avaliada durante a validação do método, um experimento mais completo foi conduzido (duplicata), na ausência do sistema NRS (*NADPH regenerating system*) como também na ausência dos microssomas, durante 1 hora.

A concentração de substrato avaliada foi de $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ (7100 ng mL^{-1}) e foi possível observar (Figura 11) que não houve o metabolismo do substrato sem a adição dos cofatores ou na ausência dos microssomas, comprovado pelo não decaimento da área durante a incubação.

As velocidades do metabolismo mediado pelo CYP normalmente apresentam comportamentos lineares em relação à concentração de proteínas na faixa de $0,2 - 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (ZHANG e KAMINSKY, 2008). Para a definição de um intervalo linear para a concentração de proteínas, primeiramente foi realizado um experimento avaliando as seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg mL^{-1} de proteína ($n = 3$). Nesse intervalo, a formação da *N*-Dm-R foi linear em todo o intervalo escolhido, porém, o mesmo não foi observado para o metabólito *p*-OH-R, já que acima da concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$, o gráfico apresentou um platô.

Figura 11. Cromatogramas referentes à análise de (A) meio microssomal fortificado com os analitos (concentração de 2000 ng mL^{-1}), (B) meio de incubação na ausência do sistema NRS. (C) meio de incubação na ausência da fração microssomal. Condições cromatográficas: Coluna X-Terra C-18 ($100 \text{ mm} \times 3,9 \text{ mm}$, partículas de $3,5 \mu\text{m}$), utilizando água:acetonitrila:ácido acético ($85:15:0,5, \text{v/v/v}$) como fase móvel, à 22°C , sob condições isocráticas, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção em 245 nm . (1) *N*-Dm-R, (2) RSG e (3) *p*-OH-R.

Um novo intervalo foi estabelecido nas seguintes concentrações: $0,025$; $0,2$; $0,4$; $0,6$; $0,8$; $1,0$ e $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteína ($n = 3$). Nessas condições, a formação da *N*-Dm-R continuou a ser linear ($r = 0,9955$) e o intervalo $0,2 - 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ também foi linear para a formação do *p*-OH-R ($r = 0,9742$). Por isso, a concentração de proteína foi definida em $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$, conforme demonstrado na Figura 12.

Figura12. Definição do intervalo linear para a formação dos metabólitos *N*-Dm-R e *p*-OH-R em função da concentração de proteínas microsossomais no meio de incubação. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4, tempo de incubação de 20 minutos, concentração do substrato (RSG) 10,56 mol L⁻¹. (5000 ng mL⁻¹).

Definida a concentração de proteínas, o próximo passo foi estabelecer o intervalo linear para o tempo de incubação. As enzimas do CYP-450 possuem uma atividade baixa quando comparada a outros sistemas enzimáticos, devido a isso, pode ser necessário estender o tempo de incubação para 60 min, ou até mais.

Normalmente recomenda-se o emprego de seis pontos para estabelecer o intervalo linear (ZHANG e KAMINSKY, 2008). Os tempos de incubação avaliados foram: 3, 5, 10, 20, 30, 45 e 60 min, conforme mostrado na Figura 13.

Nessas condições, observou-se que o metabólito *N*-Dm-R apresentou formação linear no intervalo de tempo estabelecido ($r = 0,9767$), mas quanto ao metabólito *p*-OH-R, o intervalo linear ($r = 0,9607$) foi de 3 a 30 min. Portanto, para estabelecer a constante de Michaelis-Menten, o tempo para esse metabólito foi variado no período de 3 a 30 minutos.

Figura 13. Definição do intervalo linear para a formação dos metabólitos *N*-Dm-R e *p*-OH-R em função do tempo de incubação. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4, concentração de proteínas microsossomais de 0,8 mg por mL de meio de incubação, concentração do substrato de 10,56 mol L⁻¹ (5000 ng mL⁻¹).

A variação do tempo de incubação e da concentração do substrato permite determinar em qual período o consumo do analito ou a produção do metabólito é linear, bemcomo a velocidade inicial (V_0) de consumo ou aparecimento para cada concentração avaliada. O estudo foi realizado em triplicata, empregando as seguintes concentrações do substrato: 2,64; 5,28; 10,56; 21,12; 26,40; 42,24; 52,80; 66,00; 79,20; 105,60 e 158,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, o que corresponde as seguintes concentrações em $\mu\text{g mL}^{-1}$: 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0, respectivamente. O tempo de incubação foi variado no seguinte intervalo: 3, 5, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos (*N*-Dm-R) e 3, 5, 10, 20, 30 (*p*-OH-R) para cada concentração de substrato. Como pode ser observado na Tabela 9, o aumento da concentração do substrato causa um aumento na inclinação da reta (*slope*), portanto, na velocidade inicial. Esses dados da inclinação da curva foram utilizados para determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e da velocidade máxima (V_{max}).

Tabela 9. Avaliação da formação dos principais metabólitos frente a diferentes concentrações de substrato (RSG), através da regressão linear simples pelo método dos mínimos quadrados

RSG ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Coeficiente de correlação ^a	Slope ^a	Coeficiente de correlação ^b	Slope ^b
2,64	0,9920	0,0042	NQ	NQ
5,28	0,9747	0,0085	NQ	NQ
10,56	0,9767	0,0151	0,9995	0,0050
21,12	0,9772	0,0181	0,9524	0,0090
26,40	0,9849	0,0213	0,9884	0,0100
42,24	0,9839	0,0292	0,9752	0,0120
52,80	0,9808	0,0304	0,9995	0,0140
66,00	0,9828	0,0336	0,9700	0,0180
79,20	0,9680	0,0405	0,9618	0,0270
105,60	0,9864	0,0502	0,9980	0,0270
158,40	0,9695	0,0500	0,9731	0,0240

NQ: picos detectados, porém abaixo do limite de quantificação. a) formação de *N*-Dm-R (μmol por 0,8 mg mL^{-1} de proteínas) x tempo (3-60 min) e b) formação de *p*-OH-R (μmol por 0,8 mg mL^{-1} de proteínas) x tempo (3-30 min)

Estabelecidas as condições lineares para a quantidade de proteínas microsossomais e determinada a velocidade inicial para cada concentração no intervalo de tempo avaliado, a etapa seguinte foi a determinação do K_m e $V_{\max}$ para a formação dos dois principais metabólitos da RSG. A Figura 14 mostra o gráfico de Michaelis-Menten para ambos os metabólitos e a Tabela 10 mostra os valores de K_m e $V_{\max}$ obtidos.

Figura 14. Gráficos de Michaelis-Menten obtidos plotando o *slope* versus a concentração de substrato. Temperatura de incubação de 37°C, pH do meio 7,4 e concentração de proteínas microsossomais de 0,8 mg por mL de meio de incubação.

Tabela 10. Constantes de Michaelis-Menten e $V_{\max}$ obtidos através do estudo de cinética enzimática para a formação dos principais metabólitos da RSG

Metabólitos	K_m aparente [estimativa do desvio padrão] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$V_{\max}$ aparente [estimativa do desvio padrão] ($\eta\text{mol/min/mg proteína}$)
N-Dm-R	58,14 [11,85]	87,30 [8,04]
p-OH-R	77,84 [36,77]	51,64 [12,25]

K_m , constante de Michaelis-Menten; $V_{\max}$, velocidade máxima para a formação do metabólito

A equação de Michaelis-Menten é a equação da velocidade para uma reação catalisada enzimaticamente e com um único substrato. É uma expressão da relação quantitativa entre a velocidade inicial V_o , $V_{\max}$, e a concentração inicial do substrato (S), todas relacionadas através da constante de Michaelis-Menten ou K_m . K_m é equivalente à concentração de substrato na qual V_o é igual à metade de $V_{\max}$, e indica a afinidade de uma enzima pelo seu substrato. Quanto menor for o valor de K_m , maior será a afinidade da enzima pelo substrato (ZHANG e KAMINSKY, 2008).

Para estimar o K_m com razoável exatidão, recomenda-se que a concentração de substrato avaliada seja 0,3 a 3 vezes o K_m aparente, condição que foi obtida nesses experimentos, visto que o K_m aparente foi no mínimo duas vezes menor que a maior concentração de substrato avaliada e mais que três vezes maior que a menor concentração de substrato avaliada (ZHANG e KAMINSKY, 2008).

A cinética do metabolismo da RSG foi avaliada por Baldwin, Clarke e Chenery (1999) em estudos de metabolismo *in vitro* empregando fração microssomal de fígado humano. Nesse estudo, os autores observaram valores aproximados de K_m de 6 μM e 16 μM e $V_{\max}$ de 0,66 e 1,84 $\eta\text{mol min mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente, para p-OH-R e N-Dm-R, demonstrando uma maior capacidade para N-desmetilação.

De acordo com os gráficos de Michaelis-Menten (Figura 14) e Tabela 10 é possível observar que a velocidade máxima para o N-Dm-R foi maior que a observada para o p-OH-R, de forma semelhante ao que foi observado com microssomas humanos (BALDWIN, CLARKE e CHENERY, 1999). Também é possível observar uma maior afinidade do substrato na formação do N-Dm-R em relação ao p-OH-R, já que o primeiro apresentou um menor K_m . Diferenças numéricas entre os dois estudos podem ser explicadas pelo conteúdo de CYP2C (família de enzimas responsáveis pela metabolização da RSG) que difere entre

humanos (pmol mg^{-1} de proteínas microssomais) e ratos (638 pmol mg^{-1} de proteínas microssomais) (LIN et al., 1998).

Estudos de disposição cinética em plasma humano também confirmam os resultados aqui relatados. Kim et al. (2009) descreveram pela primeira vez um estudo farmacocinético de disposição cinética da RSG determinando não só as concentrações plasmáticas da *N*-Dm-R e da RSG, avaliadas em um estudo anterior (O'MAILLE et al., 2008), mas também as concentrações plasmáticas do metabólito *p*-OH-R. As menores concentrações plasmáticas do *p*-OH-R podem ser explicadas também pela depuração desse metabólito através da sulfatação. Os metabólitos sulfatados equivalem a 35 % da dose excretada na urina, enquanto que os outros metabólitos juntos equivalem a 4 % (COX et al., 1999).

3.4.4.2 Identificação de outros metabólitos formados no estudo de metabolismo

Durante os estudos de metabolismo *in vitro* para determinação das constantes de cinética enzimática, outros picos foram observados, conforme mostrada na Figura 15.

A espectrometria de massas é uma ferramenta importante na detecção e identificação de metabólitos, primeiramente pelo fato de ser facilmente acoplada ao HPLC, além de sua alta detectabilidade e seletividade. Com isso, é possível separar, detectar e identificar muitos metabólitos na presença de materiais endógenos, sendo essa ferramenta analítica muito apropriada para estudos de metabolismo (ZHANG e KAMINSKY, 2008).

Os meios reacionais submetidos ao processo de metabolismo (concentração do substrato de $105,60 \mu\text{mol L}^{-1}$) e preparação de amostras anteriormente definidos foram analisados por LC-MS-MS. As transições monitoradas no SRM foram aquelas estabelecidas no trabalho de Cox et al. (2000), que analisou diversos metabólitos da RSG em urina. As energias do cone e de colisão foram estabelecidas por infusão direta das soluções-padrão de RSG e dos dois metabólitos disponíveis ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), preparadas na fase móvel, empregando uma bomba de infusão na vazão de $20 \mu\text{L min}^{-1}$. A voltagem do cone (kV) foi definida em 30 kV para a RSG e metabólitos,

enquanto que a energia de colisão (eV) ficou definida em 40 eV para a RSG e 35 eV para os metabólitos.

Figura 15. Picos observados nos estudos de metabolismo *in vitro* da RSG empregando fração microssomal de fígado de ratos. Concentração do substrato de 105,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tempo de incubação de 60 min, temperatura de incubação de 37°C, pH do meio de 7,4 e concentração de proteínas microssomais de 0,8 mg por mL de meio de incubação.

Os metabólitos identificados nesse estudo, seus fragmentos no modo SRM e seus tempos de retenção são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Tempos de retenção, razão m/z $[M+H]^+$, fragmento monitorado na transição e estrutura molecular dos metabólitos formados após metabolismo *in vitro* empregando a fração microsomal de fígado de ratos.

Metabólitos	Tempo de retenção (min)	$[M+H]^+$	Fragmento	Estrutura molecular
<i>N</i> -desmetil-hidroxi-rosiglitazona	7,01	360	137
<i>N</i> -Dm-R	7,38	344	121
<i>N</i> -desmetil-hidroxi rosiglitazona	7,92	360	137
RSG	8,39	358	135
<i>p</i> -OH-R	11,89	374	151
Orto-hidroxi-rosiglitazona	12,46	374	151

1. Isômeros de posição (hidroxila presente no anel aromático em posição orto ou para)

3.5 Conclusões

Os resultados obtidos no desenvolvimento e validação de um método para a análise de RSG, *N*-Dm-R e *p*-OH-R em fração microssomal de fígado de ratos foram bastante apropriados e permitiram aplicá-lo em um estudo para avaliar o metabolismo *in vitro* desse fármaco. Pela primeira vez, a técnica de extração HF-LPME foi empregada para a análise simultânea da RSG e seus principais metabólitos.

O método apresentado por Kim et al. (2009) é o único descrito na literatura capaz de quantificar a RSG, *N*-Dm-R e *p*-OH-R, simultaneamente. Apesar do LQ obtido no método desenvolvido neste estudo ter sido bem superior em relação ao descrito na literatura (50 e 1 ng mL⁻¹, respectivamente), foi suficiente para aplicação no estudo de metabolismo *in vitro*. Além disso, este método permite a extração de 36 amostras simultaneamente e utiliza uma técnica de detecção mais simples (UV).

Através dos estudos de cinética enzimática foi possível determinar a constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) para os principais metabólitos. *N*-Dm-R apresentou menor valor de K_m , demonstrando uma maior afinidade dos microssomas de ratos por essa via metabólica. O V_{max} da *N*-Dm-R foi superior ao encontrado para *p*-OH-R, demonstrando que ele é preferencialmente formado, da mesma forma que com microssomas humanos.

O uso da espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida possibilitou identificar outros metabólitos formados durante o metabolismo da RSG, além dos seus dois metabólitos mais importantes, *N*-Dm-R e *p*-OH-R.

3.6 Referências Bibliográficas

ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCAO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 774, p. 215-222, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alerta SNVS/Anvisa/Nuvig/Gfarm nº 04, de 29 de Setembro de 2010. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/posuso/farmacovigilancia>. Acesso em 1 de dezembro de 2011.

AZZAM, K.M.A.; MAKAHLEAH, A.; SAAD, B.; MANSOR, S.M. Hollow fiber liquid-phase microextraction for the determination of trace amounts of rosiglitazone (anti-diabetic drug) in biological fluids using capillary electrophoresis and high performance liquid chromatographic methods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1217, n. 23, p. 3654-3659, 2010.

BALDWIN, S.J.; CLARKE, S.E.; CHENERY, R.J. Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the *in vitro* metabolism of rosiglitazone. **Journal of Clinical Pharmacology**, Thousand Oaks, v. 48, n.3, p. 424-432, 1999.

BORGES, E.M.; GORAIEB, K.; COLLINS, C.H. O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações. **Química Nova**, São Paulo, 2012. No prelo.

BRANDON, E.F.A.; RAAP, C.D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H.M. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.189, n. 3, p. 233-246, 2003.

COX, P.J.; RYAN, D.A.; HOLLIS, F.J.; HARRIS, A.M.; MILLER, A.K.; VOUSDEN, M.; COWLEY, H. Absorption, disposition, and metabolism of rosiglitazone, a potent thiazolidinedione insulin sensitizer, in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 28, n.7, p. 772-780, 2000.

DE OLIVEIRA, A.R.M.; MAGALHÃES, I.R.S.; DE SANTANA, F.J.M.; BONATO, P.S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 627-644, 2008.

FDA – Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, 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 optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1158, n. 1-2, p. 2-14, 2007.

HE, J.; HU, Y.F.; DUAN, L.F.; TAN, Z.R.; WANG, L.S.; WANG, D., ZHANG, W.; LI, Z.; LIU, J.; TU, J.H.; YAO, Y.M.; ZHOU, H.H. Sensitive and selective liquid chromatography–mass spectrometry method for the quantification of rosiglitazone in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 580-585, 2007.

JIA, L.; LIU, X. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): *in vitro* experiments. **Current Drug Metabolism**, Sharjah, v.8, n. 8, p. 822-829, 2007.

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

LAKE, B.G. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. **Biochemical Toxicology – a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1987, cap. 8, p. 183-215.

LIN, J.H. Applications and limitations of interspecies scaling and *in vitro* extrapolation in pharmacokinetics. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 26, n. 12, p. 1202-1212, 1998.

LIPSCOMB, J.C.; POET, T.S. *In vitro* measurements of metabolism for application in pharmacokinetic modeling. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 118, n. 1, p. 82-103, 2008.

MAGALHÃES, I.R.S.; BONATO, P.S. Enantioselective determination of chloroquine and its *n*-dealkylated metabolites in plasma using liquid-liquid-phase microextraction

and LC-MS. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 31, n. 16-17, p. 3106-3116, 2008.

OWENS, D.R. Thiazolidinediones: a pharmacological overview. **Clinical Drug Investigation**, Auckland, v. 22, n. 8, p. 485-505, 2002.

O'MAILLE, G.; PAI, S.M.; TAO, X.; DOUGLAS JR, G.T.; JENKINS, R.G. An improved LC-ESI-MS-MS method for simultaneous quantitation of rosiglitazone and N-desmethyl rosiglitazone in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 48, n.3, p. 934-939, 2008.

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

SAHI, J; BLACK, C.B; HAMILTON, G.A.; ZHENG, X.; JOLLEY, S.; ROSE, K.A; GILBERT, D.; LECLUYSE, E.L.; SINZ, M.W. Comparative effects of thiazolidinediones on *in vitro* P450 enzyme induction and inhibition. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 31, n. 4, p. 439-446, 2002.

SCIFINDER WEB. Disponível em: <http://scifinder.cas.org>. Acesso em: 03 fev. 2012.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2 ed., New York, John Wiley & Sons, Inc., 1997. 765 p.

WEI, X.; ZHU, M. Regulatory Considerations of Drug Metabolism and Drug Interaction Studies. In: _____. **Metabolism in drug design and development**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008. Cap. 7, p. 203-236.

YAMAZAKI, H.; SUZUKI, M., TANE, K., SHIMADA, N.; NAKAJIMA, M.; YOKOI, T. *In vitro* inhibitory effects of troglitazone and its metabolites on drug oxidation activities of human cytochrome P450 enzymes: comparison with pioglitazone and rosiglitazone. **Xenobiotica**, London, v. 30, n. 1, 2000.

ZHANG, Z.Y.; KAMINSKY, L.S. Determination of Metabolic Rates and Enzyme Kinetics. In: _____. **Metabolism in drug design and development**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008. Cap. 13, p. 411-446.

CAPÍTULO 4

Análise enantiosseletiva da rosiglitazona e de seus principais metabólitos por HPLC-UV e aplicação na avaliação da racemização desses compostos

4.1 Introdução

A estrutura química característica das glitazonas é o anel tiazolidínico, constituído por um centro quiral, portanto a RSG é um fármaco quiral, comercializada como um racemato. A RSG possui o centro quiral ligado a um grupo carbonila e, sendo assim, o enantiômero (R) pode se converter no enantiômero (S) ou *vice-versa*, via tautomerismo cetoenólico (Figura 16). Entretanto, resultados recentes demonstram que esse processo é suficientemente lento para possibilitar a investigação do comportamento dos enantiômeros isoladamente (JAMALI et al., 2008). O processo de racemização pode ser influenciado por diferentes variáveis, tais como: pH, temperatura, concentração iônica, dentre outras (ALI, KUMERER e ABOUL-ENEIN, 2007).

Figura 16. Tautomerismo cetoenólico da RSG (Adaptado de JAMALI et al., 2008). *Centro quiral.

Parks et al. (1998) descrevem que a RSG possui farmacodinâmica enantiosseletiva, pois os dois enantiômeros possuem diferenças na afinidade pelo receptor $\text{PPAR}\gamma$, sendo esta maior para o enantiômero (-)-(S)-RSG. Por outro lado, até o momento não há estudos descritos na literatura sobre o comportamento farmacocinético enantiosseletivo desse fármaco, especialmente o metabolismo.

A análise enantiosseletiva da RSG é descrita em apenas duas publicações. A primeira publicação descreve o uso da CE para análise da RSG em matérias primas e formulações farmacêuticas. A separação dos enantiômeros foi obtida utilizando uma combinação de duas ciclodextrinas, a sulfobutileter- β -ciclodextrina e a dimetil- β -ciclodextrina (JAMALI, THEILL e SØRENSEN, 2004). O mesmo grupo de pesquisadores descreveu, em 2008, uma metodologia por HPLC para separar os enantiômeros da RSG e PGZ e avaliar o processo de racemização desses fármacos. Entretanto, a separação dos enantiômeros em escala preparativa empregando uma coluna Chiralcel OJ (250 mm x 4,6 mm I.D.) foi apenas parcial e a racemização foi estudada apenas somente para os fármacos e em função de alterações no pH do meio (JAMALI et al., 2008).

O objetivo inicial desse trabalho era estudar o metabolismo enantiosseletivo da RSG, mas em função dos dados da literatura sobre a possibilidade de racemização desse fármaco, decidiu-se fazer antes uma avaliação mais completa dessa característica da RSG e de seus metabólitos.

4.2 Objetivo Específico

Desenvolver um procedimento de separação cromatográfica quiral da RSG e de seus metabólitos (p-OH-R e N-Dm-R), possibilitando conhecer, através do estudo de racemização, quais variáveis na condução do estudo de metabolismo *in vitro* devem ser controladas, possibilitando realizar, posteriormente, um estudo enantiosseletivo.

4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Separação dos enantiômeros da rosiglitazona e de seus principais metabólitos empregando fases estacionárias quirais

Os padrões do fármaco maleato de RSG e dos metabólitos *N*-Dm-R e *p*-OH-R foram adquiridos da Toronto Research Chemical Inc. (North York, ON, Canadá).

As soluções-padrão utilizadas na avaliação das colunas quirais foram preparadas em metanol, na concentração de 100 µg mL⁻¹, e armazenadas à temperatura de -20°C e protegidas da ação da luz.

A separação cromatográfica dos enantiômeros da RSG e dos metabólitos *N*-Dm-R e *p*-OH-R foi avaliada no modo polar orgânico e fase normal; os seguintes solventes foram avaliados:

- 1) Metanol: Fischer Scientific (Fair Lawn, NJ, EUA) e J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA)
- 2) Acetonitrila: J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA)
- 3) Etanol: Tedia (Fairfield, OH, EUA) e Fischer Scientific (Fair Lawn, NJ, EUA)
- 4) Isopropanol: Fischer Scientific (Fair Lawn, NJ, EUA) e EM Science (Darmstadt, HE, Alemanha)
- 5) Hexano (60% de *n*-hexano) foi adquirido da Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, EUA).

O equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), empregado na avaliação das condições cromatográficas foi descrito no item 3.3.1 (e) Capítulo 3. A detecção foi feita em 245 nm.

Para seleção das condições de separação dos enantiômeros da RSG e de seus metabólitos, foram avaliadas as fases estacionárias quirais relacionadas na Tabela 12.

Tabela 12.Fases estacionárias quirais empregadas

Nome comercial da coluna*	Seletor quiral	Fornecedor (especificações)
Chiralpak AD	Tris (3,5-dimetilfenil) carbamatode amilose	Chiral Technologies, Exton, PA, EUA (250 x 4,6 mm, partículas de 10 µm)
Chiralpak AD-RH	Tris (3,5-dimetilfenil) carbamato de amilose	Chiral Technologies, Exton, PA, EUA (150 x 4,6 mm, partículas de 5 µm)
Chiralcel OD-H	Tris (3,5-dimetilfenil) carbamato de celulose	Chiral Technologies, Exton, PA, EUA (150 x 4,6 mm, partículas de 5 µm)
Chiralcel OJ	Tris (4-metilbenzoato) de celulose	Chiral Technologies, Exton, PA, EUA (250 x 4,6 mm, partículas de 10 µm)
Chiralcel OJ-H	Tris (4-metilbenzoato) de celulose	Chiral Technologies, Exton, PA, EUA (250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm)
Chiralcel OJ-R	Tris (4-metilbenzoato) de celulose	Chiral Technologies, Exton, PA, EUA (150 x 4,6 mm, partículas de 10 µm)
Chirobiotic V	Antibiótico Macroclítico Vancomicina	Advanced Separation Technologies (ASTEC), Whippany, NJ, EUA (150 x 4,6 mm, partículas de 5 µm)
Chirobiotic T	Antibiótico Macroclítico Teicoplanina	Advanced Separation Technologies (ASTEC), Whippany, NJ, EUA (150 x 4,6 mm, partículas de 5 µm)
Chirobiotic TAG	Antibiótico Macroclítico Teicoplanina Aglicona	Advanced Separation Technologies (ASTEC), Whippany, NJ, EUA (150 x 4,6 mm, partículas de 5 µm)

* H, tamanho de partícula de 5 µm; R, modo de eluição por fase reversa recomendado pelo fabricante.

4.3.2 Estudo de racemização

Primeiramente os enantiômeros da RSG e seus metabólitos foram separados em escala semi-preparativa, usando a condição cromatográfica descrita abaixo:

Coluna: Chiralpak AD-RH

Fase móvel: metanol:isopropanol (50:50; v/v)

Vazão: 0,6 mL min⁻¹

Detecção: 245 nm

Temperatura do forno: 25°C

Para tanto, utilizou-se soluções estoque da RSG e metabólitos preparadas em metanol na concentração de 500 µg mL⁻¹. Essas soluções foram injetadas separadamente dez vezes cada uma. Os enantiômeros foram coletados na saída da coluna e, após secagem sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 10 mL de metanol. Essas soluções foram então analisadas e o excesso enantiomérico foi obtido através do cálculo abaixo, onde [FE] é a fração enantiomérica, [E1] é a área do enantiômero (1) e [E2] é a área do enantiômero 2 (CASS e BARREIRO, 2011):

$$FE = \frac{[E1]}{([E1] + [E2])}$$

Em seguida, foi conduzido um estudo de cinética de racemização dos analitos nas seguintes temperaturas: -20°C (freezer); 4°C (geladeira), 25°C (temperatura ambiente controlada) e 37°C (banho-maria). Para a realização desse estudo foi empregada a seguinte condição cromatográfica:

Coluna: Chiralcel OJ-H

Fase móvel: metanol:etanol (90:10; v/v)

Vazão: 0,3 mL min⁻¹

Detecção: 245 nm

Temperatura do forno: 22°C

Uma alíquota de 1 mL da solução de cada enantiômero puro obtido no procedimento anterior foi adicionado a um tubo âmbar; o solvente foi evaporado à secua, sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi dissolvido em 1 mL de água

ultrapura. Em seguida, a solução obtida foi deixada nas temperaturas indicadas anteriormente. Em tempos previamente definidos, alíquotas de 50 μL foram retiradas, secas sob fluxo de ar comprimido e os resíduos foram dissolvidos na fase móvel, seguido de análise no sistema cromatográfico. A relação anterior para avaliar a pureza dos enantiômeros foi utilizada como resposta da racemização.

Da mesma forma, foi conduzido um estudo cinético nos seguintes pH's: 3,5, 7,4 e 10,5. Uma alíquota de 1 mL da solução de cada enantiômero foi evaporada à secura, porém nesse teste, os resíduos obtidos após evaporação do solvente foram dissolvidos em tampão acetato de amônio 50 mmol L^{-1} , ao invés de água. O ajuste de pH foi feito com ácido acético glacial ou hidróxido de amônio, conforme necessário. Como o intuito era avaliar a racemização durante o estudo de metabolismo *in vitro* enantiosseletivo, essas amostras foram incubadas em banho-maria à 37°C.

A racemização da RSG e seus metabólitos também foi avaliada na presença dos principais solventes que são empregados nos procedimentos de preparação das amostras: éter metil terc-butilico, tolueno, acetonitrila, etanol, clorofórmio, acetato de etila, hexano e diclorometano.

A influência da luz UV também foi avaliada utilizando uma câmara provida de lâmpada UV 254 nm. Uma alíquota de 1 mL da solução de cada enantiômero foi evaporada à secura sob fluxo de ar comprimido e os resíduos obtidos após evaporação do solvente foram dissolvidos em água; essas soluções foram armazenadas em cubetas de quartzo e expostas a radiação UV por 4 horas. Alíquotas de 50 μL foram retiradas de hora em hora para avaliar a taxa de racemização. Gaitani, Martinez e Bonato (2004) conduziram um estudo semelhante avaliando a influência da luz UV na racemização da tioridazina.

Avaliou-se também a influência de alguns parâmetros que são alterados durante os estudos de metabolismo *in vitro* na racemização da RSG e seus metabólitos. Nesse caso, empregou-se planejamento fatorial. Como o intuito é avaliar a interação de algumas condições que podem ser alteradas durante o estudo de metabolismo *in vitro*, optou-se por um planejamento fatorial completo, o qual permite obter informações úteis através de um número reduzido de experimentos. Os parâmetros avaliados foram: concentração do substrato, sal utilizado no preparo

do tampão e concentração do tampão. Foram usados 3 fatores e dois níveis (2^3), totalizando 8 experimentos.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Separação dos enantiômeros da rosiglitazona e de seus principais metabólitos empregando fases estacionárias quirais

4.4.1.1 Modo polar orgânico

O modo polar orgânico é caracterizado pelo uso de fases móveis contendo 100% de solventes orgânicos polares, como acetonitrila, metanol, etanol, isopropanol, ou ainda, misturas desses solventes (BONATO, JABOR e GAITANI, 2005).

A) Chiralcel OJ-R

A coluna Chiralcel OJ-R, que possui o tris (4-metilbenzoato) de celulose como seletor quiral, foi avaliada frente aos seguintes solventes orgânicos polares: metanol, etanol, isopropanol e acetonitrila. A melhor enantiosseletividade foi obtida com o metanol. À medida que algum outro solvente orgânico era adicionado ao metanol, perdia-se enantiosseletividade. O uso de aditivos, tanto ácidos (ácido trifluoracético) como básicos (dietilamina), fizeram com que os analitos perdessem afinidade pela fase estacionária e, conseqüentemente, fossem eluídos em tempos de retenção menores, quando comparados à fase móvel contendo apenas metanol. Com a adição de ácidos ou bases, observou-se ainda perda de enantiosseletividade. Portanto, esses aditivos afetam a interação dos analitos não só nos grupos silanóis residuais da sílica usada como suporte para a fase estacionária, mas também na própria fase estacionária quiral. A condição definida para a coluna Chiralcel OJ-R é apresentada na Figura 17.

Figura 17. Separação dos enantiômeros da rosiglitazona e dos metabólitos na coluna Chiralcel OJ-R no modo polar orgânico. Picos nº1 – enantiômeros da rac-*N*-Dm-R, picos nº2 – enantiômeros da rac-*p*-OH-R e picos nº3 – enantiômeros da rac-RSG. Fase móvel: metanol 100% na vazão de 0,5 mL min⁻¹.

B) Chiralcel OJ-H

A coluna Chiralcel OJ-H, que também possui o tris (4-metilbenzoato) de celulose como seletor quiral, difere da coluna Chiralcel OJ-R apenas no tamanho das partículas da fase estacionária. Como o derivado de celulose está incorporado em um suporte de sílica com partículas menores (5 µm), a coluna Chiralcel OJ-H é mais eficiente. A exemplo do que aconteceu na coluna Chiralcel OJ-R, a melhor enantiosseletividade foi obtida com o metanol. No entanto, a adição de uma pequena quantidade de etanol ou isopropanol contribuiu para um ganho na enantiosseletividade. Dessa forma, 10 % de etanol passou a ser adicionado na fase móvel. Foi observado também que a baixas temperaturas obtinha-se uma melhor resolução para os enantiômeros dos metabólitos *N*-Dm-R e *p*-OH-R, sem afetar a resolução dos enantiômeros da RSG. Sendo assim, a temperatura de trabalho foi

definida em 22°C. A vazão da fase móvel também foi otimizada e o valor obtido foi 0,3 mL min⁻¹. A separação cromatográfica obtida nessa coluna é mostrada na Figura 18; as resoluções ficaram acima de 0,96. Essas condições foram empregadas para efetuar o estudo de racemização.

Figura 18. Separação dos enantiômeros da RSG e metabólitos na coluna Chiralcel OJ-H no modo polar orgânico. Picos nº1- enantiômeros da *rac-N-Dm-R*, picos nº2- enantiômeros da *rac-p-OH-R* e picos nº3- enantiômeros da *rac-RSG*. Fase móvel constituída por metanol:etanol (90:10, v/v), temperatura do forno de 22°C e vazão de 0,3 mL min⁻¹.

C) Chiralpak AD-RH

Nessa coluna, a fase estacionária é o derivado tris (3,5-dimetilfenil) carbamato de amilose incorporado em partículas de sílica de 5 µm. A habilidade dessa coluna para o reconhecimento quiral é tão efetivo quanto da coluna Chiralcel OD-H, entretanto, alguns estereoisômeros são eluídos em ordem reversa nas duas fases estacionárias, sugerindo que elas são complementares no reconhecimento quiral. Estereoisômeros não resolvidos na coluna Chiralcel OD-H podem ser resolvidos na coluna Chiralpak AD e *vice-versa* (YASHIMA e OKAMOTO, 1995).

A melhor separação obtida no modo polar orgânico é mostrada no cromatograma da Figura 19. Apesar da enantiosseletividade apresentada, houve a coeluição de um dos enantiômeros do fármaco com um dos enantiômeros do

metabólito *N*-Dm-R. Em razão da excelente separação dos enantiômeros, essa coluna e condição foram utilizadas na separação semi-preparativa dos três compostos para a coleta dos enantiômeros puros.

Figura19. Separação dos enantiômeros da RSG e metabólitos na coluna Chiralpak AD-RH no modo polar orgânico. Picos nº1- enantiômeros da rac-p-OH-R, picos nº2- enantiômeros da rac-RSG e picos nº3- enantiômeros da rac-*N*-Dm-R. Fase móvel:metanol:isopropanol (60:40, v/v) e vazão de 0,5 mL min⁻¹.

D) Chirobiotic V, Chirobiotic T, Chirobiotic TAG

Os antibióticos macrocíclicos possuem elevado número de centros estereogênicos e de grupos funcionais, o que permite várias interações com analitos quirais. Todos antibióticos possuem grupos ionizáveis e, possivelmente, suas conformações podem variar com o pH da fase móvel (ALI, KUMERER e ABOULEIN, 2006). Em função disso, inúmeras fases estacionárias quirais baseadas em antibióticos têm sido desenvolvidas.

Alguns exemplos de seletores quirais empregados são: vancomicina, vancomicina aglicona, ristocetina A, rifamicina, estreptomicina, fradiomicina, canamicina e avoparcina. No entanto, vancomicina, teicoplanina e ristocetina A são considerados os melhores seletores quirais devido à presença de anéis

macrocíclicos fundidos, os quais permitem exibir diferentes características morfológicas, tais como cavidade e torção espiral (ALI, KUMERER e ABOUL-ENEIN, 2006).

Essas colunas podem ser utilizadas em fase normal, fase reversa, modo polar orgânico e com fluido supercrítico. Apresentam boa seletividade para aminoácidos e outros ácidos carboxílicos, mas também podem ser empregadas para compostos neutros e básicos (THOMPSON, 2005).

As possíveis interações responsáveis pelo mecanismo de reconhecimento quiral dessas colunas são: (a) complexação π - π ; (b) ligações de hidrogênio; (c) inclusão-complexação; (d) interações dipolo-dipolo; (e) interações estéreas e (f) ligações iônicas. A intensidade e o tipo da interação dependem do modo de eluição empregado. O modo de eluição fase reversa favorece as interações de inclusão-complexação e ligações de hidrogênio, enquanto que o modo normal favorece as interações por complexação π - π e interações dipolo-dipolo. Por sua vez, o modo polar orgânico favorece todas as interações citadas acima (ABOUL-ENEIN e ALI, 2000).

As fases estacionárias quirais baseadas em sílica imobilizada com vancomicina (Chirobiotic V), teicoplanina (Chirobiotic T) e teicoplanina aglicona (Chirobiotic TAG) foram avaliadas no modo de eluição polar orgânico sob diferentes condições analíticas. No entanto, em nenhuma das colunas avaliadas houve separação satisfatória dos enantiômeros.

4.4.1.2 Fase normal

O modo fase normal é caracterizado pelo uso de fases móveis compostas de hexano-álcool, normalmente isopropanol ou etanol. A essa mistura de solventes orgânicos pode-se adicionar pequenas quantidades (até 0,5%, v/v) de uma base orgânica (dietilamina) e/ou um ácido orgânico (ácido trifluoracético). O emprego desses aditivos tem por finalidade reduzir a interação de analitos básicos e ácidos com os grupos silanóis residuais presentes na sílica empregada como suporte para essas fases estacionárias. No modo fase normal, observa-se que a retenção não quiral acontece em função da polaridade do composto que está sendo analisado.

Dessa forma, os metabólitos que normalmente são mais polares que o fármaco de origem eluem com tempos de retenção superiores. Entretanto, como as interações enantiosseletivas ocorrem simultaneamente, às vezes, observa-se inversão nesse comportamento (BONATO, JABOR e GAITANI, 2005). As colunas quirais empregadas nesse modo de eluição foram a Chiralcel OJ, a Chiralcel OJ-H e a Chiralpak AD.

A) Chiralcel OJ

O tempo de análise para essa coluna foi de aproximadamente 60 minutos, e não foi possível obter a resolução dos enantiômeros da *p*-OH-R, conforme demonstrado nos cromatogramas da Figura 20.

Figura 20. Cromatogramas referentes a análise da *rac*-RSG (A), *rac*-*p*-OH-R (B) e *rac*-*N*-Dm-R (C) na coluna Chiralcel OJ em fase normal. Fase móvel: hexano:etanol: isopropanol (50:25:25, v/v/v) e vazão de 0,6 mL min⁻¹.

A coluna Chiralcel OJ possui como seletor quiral o tris (4-metilbenzoato) de celulose. O álcool que resultou em melhor enantiosseletividade, dentre os avaliados, foi o isopropanol. O etanol contribuiu para uma menor retenção dos analitos.

B) Chiralcel OJ-H

A melhor separação da RSG e seus metabólitos obtida na coluna Chiralcel OJ-H é mostrada nos cromatogramas da Figura 21.

Figura 21. Cromatograma referente a análise da *rac*-RSG (A), *rac-p*-OH-R (B) e *rac-N*-Dm-R (C) na coluna Chiralcel OJ-H em fase normal. Fase móvel: hexano:etanol:isopropanol:metanol (50:20:20:10, v/v/v/v) e vazão de 0,8 mL min⁻¹.

Com o aumento na proporção de metanol na fase móvel, observou-se uma melhor resolução dos enantiômeros do *p*-OH-R, mas uma perda na resolução dos enantiômeros da *N*-Dm-R e da RSG.

A) Chiralpak AD

Após 60 minutos de análise, não houve a eluição de nenhum analito em fase normal, em virtude disso, essa fase estacionária quiral foi descartada do estudo, na condição de fase normal.

4.4.2 Estudo de racemização

De acordo com Jamali et al. (2008), a conversão de um enantiômero da RSG em outro envolve um único composto intermediário e termina como uma mistura racêmica verdadeira, conseqüentemente, pode ser considerada como uma reação de primeira ordem reversível (JAMALI et al., 2008) e a equação utilizada para determinar a cinética foi:

$$\ln \left(\frac{c_A - c_A^e}{c_A^0 - c_A^e} \right) = -(k_1 + k_{-1})t$$

Na qual:

$[c_A]$ corresponde ao valor (%) do enantiômero determinado no tempo t , $[c_A^e]$ ao valor (%) do enantiômero no final do processo, $[c_A^0]$ ao valor (%) do enantiômero no início do processo, $[k_1]$ e $[k_{-1}]$ a taxa de racemização e $[t]$ é o tempo em horas.

A meia-vida da racemização foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$t_{0.5} = \frac{\ln 2}{k}$$

Na qual:

$[k]$ é a taxa de racemização e $[t_{0.5}]$ a meia-vida.

Essas equações foram empregadas para avaliar a cinética de racemização da RSG e seus metabólitos em diferentes condições. Primeiramente, um estudo cinético foi realizado avaliando a influência da temperatura (-20°C, 4°C, 25°C e 37°C), no período máximo de 2 meses (-20°C, 4°C) ou até verificar que houve a racemização. A conversão de um enantiômero no outro não foi observada na temperatura de -20°C, mesmo quando as amostras foram estocadas por até dois meses. Nas outras temperaturas avaliadas, percebe-se uma diminuição na meia-vida, bem como o aumento da taxa de racemização com o aumento da temperatura, conforme pode ser observado na Tabela 13.

Tabela 13. Taxa de racemização (K) e meia-vida ($t_{0,5}$) dos enantiômeros da RSG, *N*-Dm-R e *p*-OH-R em função da variação de temperatura

	RSG 1			RSG 2		
Temperatura (°C)	4	25	37	4	25	37
K (%/h)	0,001330	0,004593	0,045793	0,000769	0,013123	0,034373
$t_{0,5}$ (h)	521,09	150,91	15,14	900,95	52,82	20,17
	p-OH-R 1			p-OH-R 2		
Temperatura (°C)	4	25	37	4	25	37
K (%/h)	0,003376	0,009394	0,102773	0,002886	0,036441	0,145650
$t_{0,5}$(h)	205,30	73,79	6,74	240,16	19,02	4,76
	N-Dm-R 1			N-Dm-R 2		
Temperatura (°C)	4	25	37	4	25	37
K (%/h)	0,001255	0,003455	0,040261	0,000923	0,019228	0,044507
$t_{0,5}$(h)	552,33	200,59	17,22	750,89	36,05	15,57

Outro estudo cinético foi realizado avaliando a influência do pH na racemização da RSG e metabólitos (Tabela 14). Não houve conversão de um enantiômero no outro em condições ácidas (pH 3,5), em até 6 horas. Nos pH's 7,4 e 10,5 observou-se racemização em menos de 1 hora; a taxa de racemização em ambas condições foram semelhantes.

A racemização da RSG e metabólitos em diferentes solventes orgânicos também foi avaliada. Os solventes orgânicos testados foram: éter metil terc-butilico, tolueno, acetonitrila, etanol, clorofórmio, acetato de etila, hexano e diclorometano. As amostras ficaram na bancada por 16 horas e a conversão entre os enantiômeros não foi observada com nenhum dos solventes orgânicos avaliados.

Tabela 14. Taxa de racemização (K) e meia-vida ($t_{0,5}$) dos enantiômeros da RSG, N-Dm-R e p-OH-R em função da variação de pH

	RSG 1			RSG 2		
pH	3,5	7,4	10,5	3,5	7,4	10,5
K (%/h)	0,042313	0,330137	0,300556	0,029174	0,221193	0,286284
$t_{0,5}$ (h)	16,38	2,10	2,31	23,76	3,13	2,42
	p-OH-R 1			p-OH-R 2		
pH	3,5	7,4	10,5	3,5	7,4	10,5
K (%/h)	0,028135	0,344992	0,326569	0,039771	0,537446	0,185772
$t_{0,5}$ (h)	24,64	2,01	2,12	17,43	1,29	3,73
	N-Dm-R 1			N-Dm-R 2		
pH	3,5	7,4	10,5	3,5	7,4	10,5
K (%/h)	0,014266	0,271761	0,248493	0,037002	0,268001	0,285328
$t_{0,5}$ (h)	48,59	2,55	2,79	18,73	2,59	2,43

Em relação às amostras expostas na luz UV 254 nm, observou-se degradação da RSG e N-Dm-R após 3 horas, enquanto que para o p-OH-R, observou-se a degradação em menos de 60 minutos. Em virtude dessa degradação, não foi possível estabelecer a cinética de racemização, no entanto, pode-se observar que não houve racemização sob a influência da luz UV, pois não foi observado um aumento significativo do excesso enantiomérico.

Como indicado anteriormente, a racemização da RSG e seus metabólitos nas condições de metabolismo foi avaliada empregando planejamento fatorial. Os fatores selecionados para a realização do planejamento fatorial completo foram aqueles que podem ser alterados durante a execução do protocolo de metabolismo *in vitro*: concentração de substrato, concentração iônica e tampão (Tabela 15). As soluções tampão normalmente utilizadas para estudos de metabolismo *in vitro* são o tris-HCl e o fosfato de sódio, nas concentrações de 50 mmol L⁻¹ e 100 mmol L⁻¹ (ZHANG e KAMINSKY, 2008). Para estabelecer a cinética enzimática é necessário variar a concentração do substrato e, considerando que a concentração de substrato também pode influenciar na racemização, esse fator também foi incluído no planejamento (ALI et al., 2006). As amostras foram submetidas às mesmas condições utilizadas nos estudos de metabolismo *in vitro*, descritos no Capítulo 3, ou seja, incubação à 37°C por 1 hora.

Tabela 15. Fatores avaliados durante a execução do planejamento fatorial completo

Fatores	Nível (-1)	Nível (+1)
Tipo de tampão	Fosfato de sódio pH 7,4	Tris-HCl pH 7,4
Concentração iônica	50 mmol L ⁻¹	100 mmol L ⁻¹
Concentração substrato	1x	5x mais concentrado

Os resultados obtidos são mostrados na Figura 22, através do gráfico de Pareto.

Figura 22. Planejamento Fatorial Completo (Pareto) com três fatores (concentração de substrato, tipo de tampão e concentração do tampão) e dois níveis, totalizando 8 experimentos, para avaliar a racemização da RSG, N-Dm-R e p-OH-R em condições aplicadas em estudos de metabolismo *in vitro*.

O planejamento fatorial foi composto de três fatores e dois níveis (2^3), totalizando 8 experimentos. O intuito foi avaliar se a interação entre os fatores pode potencializar a racemização. O fator que mais afetou a taxa de racemização foi o tipo de tampão utilizado, sendo o tampão tris-HCl o que contribuiu mais para a racemização dos enantiômeros da RSG e metabólitos.

Em função dos dados da literatura (JAMALI et al., 2005), acreditava-se que a taxa de racemização fosse lenta o suficiente para permitir a condução do estudo de metabolismo *in vitro* de forma enantiosseletiva. Entretanto, os resultados aqui obtidos mostram que a racemização só pode ser evitada em meio ácido (pH 3,5), em baixas temperaturas (abaixo do 25°C) e em solventes orgânicos, ou seja condições inadequadas para realização do estudo de metabolismo *in vitro*.

4.5 Conclusões

Pela primeira vez foi descrita uma separação quiral simultânea da RSG e dos seus principais metabólitos p-OH-R e N-Dm-R, empregando para isto a coluna Chiralcel OJ-H no modo polar orgânico. Além de apresentar resoluções acima de 0,96, valores considerados adequados em análises enantiosseletivas, a fase móvel apresenta apenas metanol e etanol em sua composição, solventes relativamente baratos, voláteis, tornando possível a sua utilização na cromatografia preparativa, pouco tóxicos e compatíveis com a espectrometria de massas, detector bastante atrativo para a análise de fármacos. Além disso, não houve a necessidade da adição de aditivos orgânicos a essa fase móvel.

Usando essas condições de separação, foi possível avaliar a conversão entre os enantiômeros da RSG e metabólitos e a possibilidade de condução de um estudo de metabolismo *in vitro* enantiosseletivo. Através desse estudo, foi possível verificar que a racemização não ocorre em meio ácido (pH 3,5), em baixas temperaturas (abaixo de 25°C) e em solventes orgânicos, condições impróprias para a realização de estudos de metabolismo *in vitro*. Pelo planejamento fatorial completo foi possível observar que o tampão escolhido na etapa de metabolismo interfere no aumento da taxa de racemização, dado que ainda não havia sido descrito na literatura. Apesar de não ser possível prosseguir com o estudo de metabolismo *in vitro* enantiosseletivo, o método cromatográfico surgiu como uma importante ferramenta analítica para conhecer o comportamento de racemização da RSG e metabólitos, frente a essas condições.

4.6 Referências Bibliográficas

ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, I. Macrocyclic antibiotics as effective chiral selectors for enantiomeric resolution by liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 52, n. 11-12, p. 679-691, 2000.

ALI, I.; KUMERER, K.; ABOUL-ENEIN, H.Y. **Mechanistic principles in chiral separations using liquid chromatography and capillary electrophoresis.** **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 63, n. 7-8, p. 295-307, 2006.

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.; DE GAITANI, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2005.

CASS, Q.B.; BARREIRO, J.C. Os avanços tecnológicos na química analítica: sucessos e desafios. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 63, n. 1, p. 37-40, 2011.

DE GAITANI, C.M.; MARTINEZ, A.S.; BONATO, P.S. Degradation and configurational changes of thioridazine 2-sulfoxide. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 36, p. 601-607, 2004

JAMALI, B.; THEILL, G.C.; SØRENSEN, T.L. Generic, highly selective and robust capillary electrophoresis method for separation of a racemic mixture of glitazone compounds. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1049, n. 1-2, p. 183-187, 2004.

JAMALI, B.; BJØRNSDOTTIR, I.; NORDFANG, O.; HANSEN, S.H. Investigation of racemisation of the enantiomers of glitazone drug compounds at different pH using chiral HPLC and chiral CE. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 82-87, 2008.

PARKS, D.J.; TOMKINSON, N.C.O.; VILLENEUVE, M.S.; BLANCHARD, S.G.; WILLSON, T.M. Differential activity of rosiglitazone enantiomers at PPAR γ . **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 8, n. 24, p. 3657-3658, 1998.

THOMPSON, R. A Practical Guide to HPLC Enantioseparations for Pharmaceutical Compounds. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, New York, v. 28, n. 7, p. 1215-1231, 2005.

YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Chiral discrimination on polysaccharides derivatives. **Bullettin of the Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 68, n. 12, p. 3289-3307, 1995.

ZHANG, Z.Y.; KAMINSKY, L.S. Determination of metabolic rates and enzyme kinetics. In: _____. **Metabolism in drug design and development**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008. Cap. 13, p. 411-446.

CAPÍTULO 5

Análise da pioglitazona e seus principais metabólitos empregando HF-LPME e CE, com aplicação em estudos de metabolismo *in vitro* empregando fração microssomal de fígado de ratos

5.1 Introdução

A PGZ é administrada geralmente em combinação com outros antidiabéticos orais. Após a retirada da troglitazona e da RSG do mercado (essa última foi retirada em alguns países, dentre eles o Brasil), a PGZ passou a ser a principal opção terapêutica entre as TZD's (ANVISA, 2010).

De acordo com Shen et al. (2003), além dos seis metabólitos da PGZ observados em humanos, quatro outros metabólitos são formados em ratos (M-VII, M-VIII, M-IX e M-X). Nesse estudo, as condições de metabolismo *in vitro* empregando microsomas de fígado de ratos, foram: concentração de substrato de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), tempo de incubação de 90 minutos e concentração de proteínas microsomais de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Nestas condições foi possível observar alguns desses metabólitos em níveis de traços: M-II, M-IV, M-VII, M-VIII e M-IX.

Como pode se observado na Tabela 1, todos os métodos descritos na literatura para análise da PGZ em matrizes biológicas fazem uso de HPLC com diferentes detectores e técnicas de preparação de amostras. Até o momento, a CE ainda não foi empregada para análise desse fármaco em matrizes biológicas. Com relação à HF-LPME, os pesquisadores Tahmasebi, Yamini e Saleh (2009) descreveram, pela primeira vez, o emprego dessa técnica de extração para análise da PGZ em urina e plasma de humanos. Entretanto, o método desenvolvido possibilita apenas a análise do fármaco e não dos metabólitos. Portanto, essas duas técnicas foram selecionadas para o desenvolvimento de um método para determinação de PGZ e seus principais metabólitos na fração microsomal de fígados de ratos, com o objetivo de aplicação em um estudo de metabolismo *in vitro*.

5.2 Objetivo Específico

Desenvolver um método para análise da PGZ e seus principais metabólitos (M-IV e M-III) empregando a CE e HF-LPME, a fim de avaliar a metabolização da PGZ empregando a fração microssomal de fígado de ratos.

5.3 Materiais e Métodos

5.3.1. Otimização da análise por eletroforese capilar

a. Reagentes

O sal fosfato monossódico monoidratado e o sal fosfato dissódico diidratado foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o hidróxido de sódio foi obtido da Spectrum (New Brunswick, NJ, EUA). Esses reagentes, todos grau p.a., foram usados na preparação da solução de eletrólitos.

b. Soluções-padrão

Os padrões do fármaco PGZ e dos metabólitos M-IV e M-III (todos com pureza de 98 %) foram adquiridos da Toronto Research Chemical Inc. (North York, ON, Canadá). As soluções-padrão foram preparadas em metanol (Fischer, Fair Lawn, NJ, EUA), na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, e armazenadas à temperatura de -20°C e protegidas da ação da luz.

c. Capilar

O capilar de sílica fundida revestido externamente por uma camada de poliamida foi adquirido em rolos de 25 m da empresa Microsolv (Eatontown, NJ, EUA). O capilar empregado no desenvolvimento do método eletroforético apresenta diâmetro interno de $50 \mu\text{m}$ e foi preparado no laboratório com aproximadamente 47,5 cm totais e 40 cm efetivos. A janela óptica de detecção ($\approx 0,5$ cm de comprimento) foi construída pela remoção do revestimento de poliamida a 8 cm de uma das extremidades do capilar, através da aplicação de calor. A poliamida queimada foi removida com o auxílio de um algodão embebido em acetona adquirida da Mallinckrodt (Paris, KY, EUA).

d. Sistema Eletroforético

As análises eletroforéticas foram realizadas em um sistema de eletroforese capilar da marca Agilent Technologies (Waldbrook, Alemanha), modelo G1600A,

composto por uma fonte de alta tensão, um amostrador automático e um detector por arranjo de diodos, operando em 190 nm. O equipamento foi controlado pelo *software* Chemstation 3D-CE, versão A.08.03, que foi também usado na aquisição e tratamento dos dados.

e. Equipamentos empregados no preparo da solução tampão e amostras

Os constituintes das soluções tampão foram pesados em balança analítica Ohaus, modelo adventurer (Pine Brook, NJ, EUA). O potenciômetro utilizado nas aferições de pH das soluções tampão foi da marca Thermo, Orion 420 A+ (Waltham, MA, EUA). Para degaseificação e dissolução dos reagentes das soluções empregadas na análise eletroforética foi utilizado um aparelho de ultra-som da marca Thorton Unique, modelo USC1450 (Santo André, SP, Brasil). 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 aquosas.

f. Condicionamento de capilares novos

Antes do primeiro uso, os capilares novos foram condicionados com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ durante 30 minutos, seguido de água purificada no sistema Milli-Q plus durante 30 minutos.

g. Condicionamento do capilar e substituição do tampão de análise durante as análises

No início do dia, o capilar era condicionado com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 10 minutos, seguido de uma etapa de lavagem com água ultrapura por 10 minutos e uma terceira etapa com o eletrólito de análise durante os mesmos 10 minutos.

Entre cada análise o capilar era condicionado por 2 minutos com NaOH 0,1 mol L⁻¹, 2 minutos com água ultrapura e 2 minutos com o eletrólito de análise. O eletrólito de análise era substituído após 8 corridas.

Ao final das análises, o capilar era lavado com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 10 minutos, seguido por uma etapa de lavagem com água ultrapura durante os mesmos 10 minutos.

h. Otimização da separação eletroforética

Para a otimização da separação eletroforética, a PGZ e metabólitos (M-IV e M-III) foram injetados na concentração de 10 µg mL⁻¹. Para isso, 100 µL das soluções-padrão do fármaco e metabólitos na concentração de 100 µg mL⁻¹ foram transferidos para tubos de extração e, em seguida, o solvente foi evaporado à secura sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos obtidos foram dissolvidos em 1 mL de água ultrapura e depois 250 µL foram transferidos para *vials* do CE.

Os seguintes parâmetros foram estudados: temperatura do capilar (25°C e 35°C), tensão (20 kV e 30 kV) e a concentração do eletrólito de análise (25, 50 e 80 mmol L⁻¹).

A injeção das amostras foi feita pela aplicação de pressão (50 mBar) durante 15 segundos na extremidade oposta ao detector. Todos os experimentos foram realizados no modo de polaridade normal.

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

a. **Membrana capilar de polipropileno** Accurel PP Q 3/2 com diâmetro internode 600 µm, parede com espessura de 200 µm e poros de 0,2 µm (Membrana, Wuppertal, Alemanha)

b. Solventes orgânicos

O solvente orgânico (grau p.a.) selecionado para impregnação da membrana de polipropileno foi o 1-octanol (St. Louis, MO, EUA).

c. Reagentes (grau p.a.)

- 1) Fosfato monossódico monoidratado: Merck (Darmstadt, Alemanha)
- 2) Fosfato dissódico diidratado: Merck (Darmstadt, Alemanha)

- 3) Hidróxido de sódio: Spectrum (New Brunswick, NJ, EUA)
- 4) Ácido perclórico: Nuclear (São Paulo, SP, Brasil)
- 5) Ácido fosfórico: Labsynth (Diadema, SP, Brasil)
- 6) Ácido acético glacial: Cinética (Jandira, SP, Brasil)
- 7) Ácido clorídrico: Mallinckrodt (Xalostoc, Estado do México, México)

d. Soluções-padrão

Para avaliação da HF-LPME, as soluções-padrão de PGZ, M-IV e M-III foram preparadas em metanol, na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, armazenadas à temperatura de -20°C e protegidas da ação da luz.

e. Equipamentos e outros materiais usados na HF-LPME

Os equipamentos utilizados no procedimento de extração são os mesmos descritos no item 3.3.2 (e), Capítulo 3.

f. Técnica de extração por HF-LPME

A otimização do método de extração da PGZ e seus metabólitos também foi feita empregando planejamento experimental. Para tanto, $100 \mu\text{L}$ das soluções-padrão do fármaco e metabólitos na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram transferidos para tubos de extração e, em seguida, o solvente foi evaporado à secura sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos obtidos foram dissolvidos em 1 mL de tampão fosfato 1 mol L^{-1} , pH 7,4, contendo 1 mg mL^{-1} de proteínas microssomais. Posteriormente, adicionou-se $400 \mu\text{L}$ de ácido perclórico 6% (v/v) para mimetizar o que acontece durante o estudo de metabolismo (o ácido é adicionado para cessar a atividade enzimática). O volume final foi completado para $4,0 \text{ mL}$ com água. Amostras contendo apenas a fração microssomal e reagentes necessários para executar o metabolismo *in vitro* também foram extraídas para verificar a presença de interferentes endógenos que pudessem interferir nas condições de análise pré-estabelecidas.

Para cada extração, uma membrana de polipropileno de 15 cm de comprimento foi fixada nas duas extremidades de ponteiros plásticos (MAGALHÃES e BONATO, 2008) e imersa durante 15 segundos em 1-octanol para sua deposição

nos poros. Em seguida, o excesso de solvente foi retirado em banho ultrassônico durante 15 segundos. Após impregnação, 50 µL da fase aceptora foram introduzidos no interior da membrana capilar, utilizando uma microseringa. A membrana capilar foi então imersa na fase doadora presente no tubo de extração. Após agitação por períodos de tempo pré estabelecidos, a fase aceptora (volume de 40 µL) foi retirada da membrana usando uma microseringa e transferida para o *vial* de eletroforese capilar. Uma alíquota de 20 µL de água ultrapura foi adicionada à fase aceptora para diluir a amostra que seria injetada no sistema CE e promover o efeito *stacking* (MORAES et al., 2009).

Inicialmente, foram realizados experimentos (triplicata) com o intuito de determinar a combinação de três soluções ácidas (fase aceptora) com o 1-octanol que conduzissem a mais significativa resposta quanto à extração. As seguintes soluções foram usadas como fase aceptora: ácido clorídrico, ácido acético e ácido fosfórico, todos na concentração de 0,1 mol L⁻¹. Em seguida, foi realizado um planejamento fatorial fracionário com 4 fatores: pH da fase doadora (para manter o pH 10,0, 400 µL de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹ foi acrescentado após a adição do ácido perclórico 6%), concentração de ácido da fase aceptora, agitação da amostra e tempo de extração, conforme apresentado na Tabela 16. Os resultados foram avaliados pelo software estatístico Minitab 14.0 (State College, PA, EUA).

Tabela 16. Fatores estudados no planejamento fatorial fracionário na otimização da HF-LPME

Fatores	Nível (-)	Nível (+)
Tempo de extração (min)	15	45
Concentração de ácido na fase aceptora (mol L ⁻¹)	0,01	0,1
Velocidade da agitação (rpm)	1000	1500
pH da fase doadora	6	10

5.3.3. Validação da metodologia analítica

O método foi validado conforme recomendações de guias oficiais do FDA (2001) e ANVISA (2003) pela avaliação dos seguintes parâmetros: recuperação, linearidade, LQ, precisão, exatidão, seletividade, robustez e estabilidade (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

Nos estudos de validação, alíquotas de 1 mL do meio de incubação (720 μL de tampão fosfato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, 250 μL de solução tampão tris-HCl 50 mmol L^{-1} / KCl $0,154 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 e 25 μL de fração microssomal contendo $28,8 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas) foram fortificadas com PGZ e os metabólitos M-IV e M-III.

Posteriormente, adicionou-se 400 μL de ácido perclórico 6% (v/v). O volume final foi completado para 4,0 mL com tampão fosfato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4. A RSG foi usada como padrão interno na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, resultando na concentração final de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e, em seguida, efetuou-se o procedimento de extração e análise.

O procedimento empregado na validação foi o mesmo descrito no item 3.3.3 do Capítulo 3. Para avaliação da recuperação, precisão e exatidão, as amostras do meio microssomal foram fortificadas com 50 μL de soluções-padrão de PGZ, M-IV e M-III nas concentrações de 20, 200 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para PGZ e 10, 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os metabólitos M-IV e M-III, resultando em concentrações finais no meio de incubação de 1000, 10000 e 20000 ng mL^{-1} e 500, 1000 e 1500 ng mL^{-1} , respectivamente para PGZ e metabólitos.

A linearidade do método foi avaliada através da construção de três curvas analíticas, usando o meio de incubação fortificado com 200, 1000, 4000, 10000, 20000 e 25000 ng mL^{-1} de PGZ e 200, 350, 500, 1000, 1500 e 2000 ng mL^{-1} dos metabólitos.

Para determinação do LQ, 5 alíquotas de 1 mL do meio de incubação foram fortificadas com 200 ng mL^{-1} de cada analito e analisadas com base em uma curva analítica preparada simultaneamente.

A seletividade do método foi avaliada pela análise do meio de incubação na ausência do substrato (PGZ) e de seus principais metabólitos (M-IV e M-III), na ausência da fração microssomal, responsável pelo metabolismo do substrato, e na ausência do cofator (NADPH).

A estabilidade ($n = 3$) nas condições de incubação (37°C , 1 hora) e a temperatura ambiente (25°C , 12 horas) foi avaliada empregando o meio de incubação fortificado com 1000 ng mL^{-1} e 20000 ng mL^{-1} de PGZ e 500 ng mL^{-1} e 1500 ng mL^{-1} dos metabólitos.

5.3.4. Metabolismo *in vitro*

O estudo de metabolismo *in vitro* da PGZ foi conduzido de maneira similar ao realizado para a RSG (aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA, anexo 1). Os reagentes e equipamentos empregados são os mesmos descritos nos itens 3.3.4 (a) e 3.3.4 (d), do Capítulo 3, respectivamente.

A fração microssomal de fígado de ratos (Wistar machos, pesando 180 a 200 g e obtidos do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, classificação SPF (*Specific Patogen Free*)) foi obtida seguindo o procedimento descrito no item 3.3.4 (e) do Capítulo 3. A dosagem de proteínas foi feita empregando o procedimento descrito no item 3.3.4 (f) do Capítulo 3.

Para esses experimentos, utilizou-se a concentração de substrato de $50,90 \mu\text{mol L}^{-1}$ (20000 ng mL^{-1}). Uma alíquota de $25 \mu\text{L}$ da solução-padrão de PGZ ($800 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi transferida para um tubo de vidro e, em seguida, foram adicionados $250 \mu\text{L}$ da solução NRS contendo NADP, glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase em solução tampão tris-HCl 50 mmol L^{-1} / KCl $0,154 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, resultando em concentrações no meio de incubação de $1,7 \text{ mg mL}^{-1}$, $7,8 \text{ mg mL}^{-1}$ e 1,5 unidades, respectivamente. Após 5 minutos de incubação a 37°C , a fração microssomal foi adicionada e o volume final foi completado para 1,0 mL com tampão fosfato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4. Depois da incubação, $400 \mu\text{L}$ de ácido perclórico 6% (v/v) foram adicionados para cessar a atividade das enzimas presentes no meio de incubação. O volume final foi completado para 4,0 mL com tampão fosfato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 (pH final 6,0) e, em seguida, procedeu-se a extração por HF-LPME.

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Condições eletroforéticas

Como sugerido na literatura, uma das estratégias para a determinação de compostos fracamente básicos como a PGZ (pKa's de 5,53 e 6,35) e seus metabólitos (pKa's de 4,68 e 6,35 para o M-IV e 3,38 e 6,35 para o M-III) (SCIFINDER WEB), é realizar a análise em meio ácido, portanto, o pH da solução de eletrólitos foi definido em pH 2,5. Neste pH, os analitos estão protonados e migram em direção ao cátodo devido as suas mobilidades eletroforéticas, já que o fluxo eletroosmótico é baixo.

Nesses experimentos iniciais, 100 μL das soluções-padrão de PGZ e metabólitos, preparadas em metanol, foram evaporados à secura sob fluxo de ar comprimido e os resíduos foram dissolvidos em 1000 μL água.

Para a condução da separação eletroforética da PGZ e principais metabólitos, foram otimizados os seguintes parâmetros: temperatura do capilar, tensão aplicada e concentração do eletrólito. A influência dos dois primeiros parâmetros na separação dos analitos de interesse pode ser observada na Figura 23. O eletrólito utilizado nesses experimentos foi tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 2,5.

Nessas condições foi possível obter também a separação da RSG, que será utilizada como padrão interno nos estudos posteriores. A influência da concentração do eletrólito é mostrada na Figura 24.

A temperatura em que a análise é realizada exerce sua influencia na viscosidade do eletrólito, no fluxo eletroosmótico e, conseqüentemente, nos tempos de migração. O aumento da temperatura provoca a diminuição da viscosidade da solução de eletrólitos, aumentando a mobilidade eletroforética e o fluxo eletroosmótico, o que reduz os tempos de migração (ALTRIA, 1996), como poder ser observado na Figura 23B em comparação à Figura 23A.

Figura 23. Eletroferogramas mostrando a separação de PGZ (2), seus metabólitos M-IV (3) e M-III (4) e o padrão interno RSG (1) em função da tensão aplicada no capilar e temperatura. Condições de análise: tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 2,5 e detecção em 190 nm. (A) tensão de 20 kV e temperatura de 25 °C; (B) tensão de 20 kV e temperatura de 35°C e (C) tensão de 30 kV e temperatura de 35°C.

Figura 24. Eletroferogramas mostrando a separação de PGZ (1) e seus metabólitos M-IV (2) e M-III (3) em função da concentração do eletrólito. Condições de análise: tampão fosfato de sódio (A) 25 mmol L⁻¹, (B) 50 mmol L⁻¹ e (C) 80 mmol L⁻¹, pH 2,5, tensão de 30 kV, temperatura de 35°C e detecção em 190 nm.

A tensão aplicada afeta a velocidade de migração dos analitos e também a eficiência da separação. O uso de altas tensões reduz o tempo de análise, como pode ser observado na Figura 23C em comparação à Figura 23B. Entretanto, se o calor gerado pela passagem da corrente (Efeito Joule) não for eficientemente dissipado no capilar, pode haver uma redução na eficiência (ALTRIA, 1996).

Todos os eletroferogramas obtidos nessas condições propiciaram a separação completa da PGZ, seus metabólitos e o padrão interno. Portanto, a tensão e temperatura foram fixadas em 30 kV e 35°C, respectivamente, com o objetivo de reduzir o tempo de análise.

A concentração do eletrólito possui diferentes efeitos na separação eletroforética. Altas concentrações podem gerar aquecimento excessivo do sistema devido à passagem da corrente elétrica (Efeito Joule); por outro lado, baixas concentrações podem propiciar a adsorção dos analitos na parede do capilar prejudicando o formato dos picos (TAVARES, 1997). Esse efeito pode ser observado no eletroferograma da Figura 24A.

Em função desses experimentos, as condições definidas para a separação eletroforética foram:

- ✓ Eletrólito: tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 2,5
- ✓ Voltagem: 30 kV
- ✓ Temperatura do capilar: 35°C
- ✓ Detecção: 190 nm
- ✓ Injeção: Hidrodinâmica (50 mBar por 15 segundos)
- ✓ Capilar: sílica fundida recoberto externamente por uma camada de poliamida com 50 µm de diâmetro interno e tamanho de 47,5 cm (efetivo: 40 cm).

Os parâmetros de separação na condição estabelecida são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Parâmetros eletroforéticos obtidos nas condições otimizadas

Parâmetros	RSG	PGZ	M-IV	M-III
Tempo de Migração (min)	4,91	5,07	5,30	6,33
Número de pratos (N)	128673	98949	84344	105610
Resolução (Rs)		2,62	3,31	13,67

A resolução e o número de pratos foram calculados com auxílio do *software* 3D-CE ChemStation, versão B.04.01. Para o cálculo da Rs, o *software* emprega a seguinte equação: $Rs = 1,18(t_{m2} - t_{m1}) / w_{H2} + w_{H1}$ onde t_{m2} é o tempo de migração do segundo pico e t_{m1} é o tempo de migração do primeiro pico. w_{H2} e w_{H1} são as respectivas larguras dos picos medidas a meia altura. Para o cálculo do N o *software* emprega a seguinte equação: $N = 5,54(t_m / w_H)^2$, onde t_m é o tempo de migração do analito e w_H a largura do pico na meia altura (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 1997).

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

A HF-LPME é indicada para a extração de compostos que possuam coeficientes de partição em octanol/água ($\log P$) próximos ou superiores a 2. Os metabólitos da PGZ possuem $\log P$ de 1,94 e 1,77, respectivamente para o M-IV e o M-III, enquanto que para a PGZ, o valor é de 3,50 (SCIFINDER WEB). Portanto, esses analitos podem ser eficientemente extraídos. Como indicado anteriormente, a PGZ e seus metabólitos apresentam caráter de base fraca, portanto a extração por HF-LPME em três fases deve ser feita usando uma fase aceptora acidificada. Sendo assim, foram selecionadas três soluções de ácidos para serem avaliadas quanto à eficiência de extração. De acordo com trabalhos recentes do grupo, o 1-octanol foi o solvente orgânico selecionado para ser impregnado na membrana de polipropileno, devido ao fato de promover uma maior recuperação dos analitos, principalmente os metabólitos hidroxilados (DA FONSECA e BONATO, 2010; BARTH et al., 2011). O 1-octanol também já havia sido usado na extração da RSG (Capítulo 3). Portanto, devido à similaridade de estruturas, esperava-se obter bons resultados com esse solvente.

Devido ao fato de possuir uma acidez maior que o ácido fosfórico e o ácido acético, o ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ proporcionou maiores recuperações tanto para a PGZ como para os metabólitos (M-IV e M-III), conforme pode ser observado na Figura 25. A fase aceptora ácida possibilitou a sua injeção direta no sistema eletroforético.

Figura 25. Influência das soluções ácidas na eficiência da extração da PGZ e seus metabólitos. Condições da HF-LPME: 1-octanol como solvente orgânico, tempo de extração de 30 minutos, agitação de 1500 rpm e pH final da fase doadora de 6,0.

A partir dos resultados observados até o momento, aplicou-se o planejamento fatorial fracionário, para avaliar outros fatores cujos resultados são apresentados na Figura 26.

Figura 26. Influência dos fatores avaliados individualmente (pH da fase doadora, concentração de ácido da fase aceptora, agitação da amostra e tempo de extração) na eficiência de extração da RSG (padrão interno), PGZ, M-IV e M-III por HF-LPME.

Avaliou-se outros fatores que podem influenciar na recuperação dos analitos: tempo de agitação, velocidade de agitação, pH da fase doadora e concentração do ácido na fase aceptora.

Com base nos resultados obtidos, as seguintes condições de extração foram selecionadas:

- ✓ pH 6,0: apesar do pH 10 manter os analitos na forma não ionizada, houve uma queda acentuada da recuperação dos metabólitos nessas condições, conforme pode ser observado na Figura 28. Uma possível explicação para isso poderia ser a precipitação das proteínas do meio pela adição da base, bloqueando os poros da membrana.
- ✓ Ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹: maiores concentrações permitem uma maior eficiência na extração e essa concentração não gera nenhum impedimento para a injeção direta da fase aceptora.
- ✓ Tempo de extração de 15 min: A transferência de massas entre a fase doadora – solvente orgânico – fase aceptora é um processo tempo-dependente e sua taxa é reduzida ao aproximar das condições de equilíbrio (RASMUSSEN e PEDERSEN-BJERGAARD, 2004). Os resultados obtidos para a PGZ e seus metabólitos mostram que as condições de equilíbrio são bem próximas de 15 minutos, pois a recuperação foi pouco afetada quando esse parâmetro foi alterado. Por isso, o menor valor foi selecionado para que a extração seja mais rápida.
- ✓ Velocidade da agitação de 1500 rpm: maiores velocidades de agitação permitem alcançar mais rapidamente as condições de equilíbrio; esse parâmetro também influenciou pouco a extração dos analitos, portanto o nível mais alto foi escolhido (DE OLIVEIRA et al., 2008)

5.4.3 Validação da metodologia analítica

As Tabelas 18 e 19 apresentam os resultados de recuperação da PGZ (aproximadamente 30%), M-IV (aproximadamente 40%) e M-III (aproximadamente 20%), com CV% inferiores a 15 %, valores considerados adequados pelas agências reguladoras (FDA, 2001; ANVISA, 2003) e comparáveis a outros métodos que empregam a HF-LPME para a extração de fármacos e metabólitos de matrizes biológicas (BARTH et al., 2011; DE JESUS et al., 2011).

Tahmasebi, Yamini e Saleh (2009) obtiveram uma recuperação de aproximadamente 43% para a PGZ. A principal diferença na extração executada por eles foi a utilização do éter hexílico como solvente orgânico ao invés do 1-octanol utilizado no presente método. Nos resultados obtidos para a RSG e mostrados no Capítulo 3, observou-se que esse solvente possui uma maior eficiência na extração do fármaco, porém não foi tão eficiente para a extração dos metabólitos. Em virtude disso, escolheu-se o 1-octanol para que a recuperação dos metabólitos fosse equiparável a do fármaco.

Tabela 18. Recuperação do método de análise da PGZ em fração microsomal de fígado de ratos

Concentração (ng mL⁻¹)^a	PGZ	
	Recuperação (%)	CV (%)^b
1000	31,0	7,2
10000	29,4	14,9
20000	29,9	2,5
Média	30,1	8,6

a) Cada concentração foi avaliada em triplicata

b) CV (%), coeficiente de variação expresso em porcentagem

Tabela 19. Recuperação do método de análise dos metabólitos M-IV e M-III em fração microsomal de fígado de ratos

Concentração (ng mL⁻¹)^a	M-IV		M-III	
	Recuperação (%)	CV (%)^b	Recuperação (%)	CV (%)^b
200	45,7	11,6	17,8	9,5
1000	35,4	2,3	21,3	5,3
2000	39,9	2,9	18,9	3,2
Média	40,9	12,8	19,4	10,1

a) Cada concentração foi avaliada em triplicata

b) CV (%), coeficiente de variação expresso em porcentagem

A Tabela 20 mostra as equações lineares e seus respectivos coeficientes de correlação linear (r) obtidos para as curvas analíticas da PGZ, M-IV e M-III. Os valores dos coeficientes de correlação foram superiores a 0,9874. Para evitar o efeito da heteroscedasticidade (ALMEIDA, CASTEL-BRANCO e FALCÃO, 2002), foi necessário recorrer à ponderação dos dados usando o peso $1/x^2$. Os pontos da curva

analítica ponderada apresentaram um erro relativo menor que 15%. Nessa mesma tabela são apresentados os valores de precisão (CV,%) e exatidão (E,%) para o limite de quantificação (200 ng mL^{-1}), que foram inferiores a 20% (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

Tabela 20. Linearidade e LQ do método de análise de PGZ, M-IV E M-III em fração microsomal de fígado de ratos

Analitos	Equação linear	Coefficiente de correlação	Concentração analisada (ng mL^{-1}) ^a	E (%) ^b	CV (%) ^c
PGZ	$y = 0,0005x + 0,1164$	0,9941	216,52	8,3	19,4
M-IV	$y = 0,0003x + 0,0631$	0,9926	165,65	-17,2	17,1
M-III	$y = 0,0002x + 0,0817$	0,9874	176,71	-11,6	17,8

a) LQ, $n=5$

b) E (%), erro relativo do LQ expresso em porcentagem

c) CV (%), coeficiente de variação do LQ expresso em porcentagem

Para avaliar a precisão e exatidão intra e interdias foram utilizadas alíquotas do meio de incubação (1 mL) fortificadas com 500, 10000 e 20000 ng mL^{-1} de PGZ e 500, 1000 e 1500 ng mL^{-1} dos metabólitos. Os resultados mostrados nas Tabelas 21 e 22 confirmam que o método desenvolvido apresentou precisão e exatidão dentro dos critérios recomendados na literatura (CV,% e E, % ≤ 15) (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

Tabela 21. Precisão e exatidão do método para análise de PGZ em fração microsomal de fígado de ratos

Conc. nominal (ng mL^{-1})	PGZ		
	1000	10000	20000
Intradia ($n = 5$)			
Conc. (ng mL^{-1})	941,60	10817,59	18758,50
Precisão (CV, %) ^a	10,6	12,9	5,3
Exatidão (E, %) ^b	-5,8	8,2	-6,2
Interdias ($n = 3$)			
Conc. (ng mL^{-1})	1031,08	10705,71	18373,2
Precisão (CV, %) ^a	14,0	10,0	9,9
Exatidão (E, %) ^b	3,1	7,5	-8,1

n = número de replicatas, sendo 5 para a precisão intradia e 3 para a precisão interdias (número de dias).

a) CV (%), coeficiente de variação expresso em porcentagem

b) E (%), erro relativo expresso em porcentagem

Tabela 22. Precisão e exatidão do método para análise dos metabólitos M-IV e M-III em fração microsomal de fígado de ratos

Conc. nominal (ng mL ⁻¹)	500	M-IV		500	M-III	
		1000	1500		1000	1500
Intradia (n = 5)						
Conc. (ng mL ⁻¹)	535,67	1129,88	1330,20	504,60	929,69	1650,12
Precisão (CV, %) ^a	12,8	8,3	11,9	11,7	8,7	10,6
Exatidão (E, %) ^b	7,1	13,0	-11,3	0,9	-7,0	10,0
Interdias (n = 3)						
Conc. (ng mL ⁻¹)	531,04	1076,14	1449,05	495,15	1117,52	1504,13
Precisão (CV, %) ^a	13,1	11,2	13,5	11,5	13,5	13,9
Exatidão (E, %) ^b	6,2	7,6	-3,4	-1,0	11,7	0,3

n = número de replicatas, sendo 5 para a precisão intradia e 3 para a precisão interdias (número de dias).

a) CV (%), coeficiente de variação expresso em porcentagem

b) E (%), erro relativo expresso em porcentagem

Os eletroferogramas da Figura 27 mostram que não houve qualquer interferência nos tempos de migração dos analitos.

Figura 27. Eletroferogramas mostrando a separação de RSG (1), PGZ (2) e seus metabólitos M-IV (3) e M-III (4) após extração por HF-LPME. Condições de análise: tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 2,5, tensão de 30 kV, temperatura de 35°C e detecção em 190 nm. (A) amostras extraídas do meio de incubação sem os analitos e (B) amostras extraídas do meio de incubação fortificadas com PGZ e metabólitos.

A seletividade do método foi avaliada através da análise cromatográfica de amostras extraídas do meio de incubação na ausência de PGZ e seus principais metabólitos.

A estabilidade da PGZ, M-IV e M-III foi avaliada através da incubação das amostras por 1 hora (simulando as condições de metabolismo) e deixando as amostras na bancada por 12 horas, em temperatura ambiente. Os analitos mostraram-se estáveis nas condições de metabolismo, no entanto, no estudo de estabilidade na bancada por 12 horas, houve um erro relativo acima de 15 % em relação às amostras recém-preparadas, conforme pode ser observado na Tabela 23. Portanto, as amostras submetidas ao estudo de metabolismo foram extraídas imediatamente após a incubação.

Tabela 23. Estudo de estabilidade na temperatura de incubação por 1 hora e em temperatura ambiente por 12 horas

	Temperatura ambiente (12 horas)		37 °C, 1 hora		Amostras recém-preparadas	
	CB ^a (E,%)	CA ^b (E,%)	CB ^a (E,%)	CA ^b (E,%)	CB ^a (E,%)	CA ^b (E,%)
PGZ	1079,81 (-1,5)	12783,13 (-33,0)	1157,91 (5,6)	21649,33 (13,4)	1096,79	19088,33
M-IV	513,78 (-4,1)	1228,72 (-21,7)	537,83 (0,4)	1917,07 (9,8)	535,67	1745,62
M-III	566,61 (3,5)	1249,84 (-11,5)	569,54 (4,0)	1511,48 (7,0)	547,41	1412,87

a) Concentração baixa analisada (n=3): 500 ng mL⁻¹ para os metabólitos M-IV e M-III e 1000 ng mL⁻¹ para PGZ.

b) Concentração alta analisada (n=3): 1500 ng mL⁻¹ para os metabólitos M-IV e M-III e 20000 ng mL⁻¹ para PGZ.

5.4.4 Metabolismo *in vitro*

Como indicado anteriormente, um estudo de metabolismo *in vitro* empregando microssomas de ratos, relatado por Shen et al. (2003) mostrou apenas os seguintes metabólitos presentes em níveis de traços no meio de incubação: M-II, M-IV, M-VII, M-VIII e M-IX.

Nos resultados obtidos nesse estudo e mostrados na Figura 28, é possível observar um pequeno pico relativo ao metabólito M-IV e um outro produto não

identificado com o tempo de migração de aproximadamente 3 minutos. Por outro lado, o metabólito M-III não foi observado, corroborando os estudos de Shen et al. (2003).

Figura 28 Eletroferogramas mostrando a separação de PGZ (1) e seus metabólitos M-IV (2) e M-III (3). Condições de análise: tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 2,5, tensão de 30 kV, temperatura de 35°C e detecção em 190 nm. (A) amostra extraída do meio de incubação fortificada com PGZ e metabólitos (B) amostra submetida às condições de metabolismo na ausência do cofator NRS e (C) amostra submetida ao metabolismo *in vitro*. NI: pico não identificado.

De acordo com Shen et al. (2003), os metabólitos M-II, M-IV, M-VII, M-VIII e M-IX são formados em níveis de traços. Como os metabólitos avaliados nesse estudo foram o M-IV e o M-III, o pico que apareceu no eletroferograma (C) na Figura 28 de uma amostra incubada pode ser um ou mais desses outros metabólitos.

5.5 Conclusões

Pela primeira vez, a CE foi empregada para a análise de PGZ e os metabólitos M-IV e M-III. A CE é uma alternativa interessante na separação de pequenas moléculas e mostra ser complementar à HPLC, e dentre as vantagens, destaca-se a alta eficiência. No entanto, dentre as limitações da CE, uma das principais é a detectabilidade. Em função disso e das recuperações relativamente baixas obtidas com a técnica de extração empregada, os limites de quantificação não foram muito baixos (200 ng mL⁻¹).

Em função dessas limitações, não foi possível quantificar os metabólitos da PGZ formados em níveis de trações em estudos de metabolismo *in vitro* empregando a fração microssomal de fígado de ratos. Entretanto, o método desenvolvido pode ser empregado em estudos de metabolismo baseados em outros modelos animais ou em humanos, nos quais se observam maiores concentrações desses metabólitos (SHEN et al., 2003; MUSCHLER et al., 2009).

5.6. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCAO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 774, p. 215-222, 2002.

ALTRIA, K.D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications**. Totowa: Humana Press, 1996. 349 p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Genéricos-Legislação-Resolução-RE. no. 899**, de 29 de maio de 2003. Disponível em http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&mode=PRINT_VERSION. Acesso em 1 de dezembro de 2011.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alerta SNVS/Anvisa/Nuvig/Gfarm nº 04, de 29 de Setembro de 2010. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/posuso/farmacovigilancia>. Acesso em 1 de dezembro de 2011.

BARTH, T.; SIMÕES, R.A.; PUPO, M.T.; OKANO, L.T.; BONATO, P.S. Stereoselective liquid chromatographic determination of 1'-oxobufuralol and 1'-hydroxybufuralol in rat liver microsomal fraction using hollow-fiber liquid-phase microextraction for sample preparation. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 34, n. 24, p. 3578-3586, 2011.

DE JESUS, I.; ALBUQUERQUE, N.C.P.; BORGES, K.B.; SIMÕES, R.A.; CALIXTO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; DE GAITANI, C.M.; PUPO, M.T.; DE OLIVEIRA, A.R.M. Enantioselective fungal biotransformation of risperidone in liquid culture medium by capillary electrophoresis and hollow fiber liquid-phase microextraction. **Electrophoresis**, Malden, v. 32, n. 19, p. 2765-2775, 2011.

DE OLIVEIRA, A.R.M.; MAGALHÃES, I.R.S.; DE SANTANA, F.J.M.; BONATO, P.S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n.3, p. 627-644, 2008.

FONSECA, P.; BONATO, P.S. Chiral HPLC analysis of venlafaxine metabolites in rat liver microsomal preparations after LPME extraction and application to an *in vitro* biotransformation study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 396, n. 2, p. 817-824, 2010.

FDA – Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, 2001.

MAGALHÃES, I.R.S.; BONATO, P.S. Enantioselective determination of chloroquine and its *n*-dealkylated metabolites in plasma using liquid-liquid-phase microextraction and LC-MS. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 31, n. 16-17, p. 3106-3116, 2008.

MORAES, M.L.L., MORAES, S.L., PEREIRA, E.A., TAVARES, M.F.M. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE). Parte 1. manipulação da velocidade eletroforética do analito. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1041-1046, 2009.

MUSCHLER, E.; LAL, J.; JATTER, A.; RATTAY, A.; ZANGER, U.; ZADOYAN, G.; FUHR, U.; KIRCHHEINER, J. The role of human cyp2c8 and cyp2c9 variants in pioglitazone metabolism *in vitro*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Malden, v. 105, n. 6, p. 374–379, 2009.

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

SCIFINDER WEB. Disponível em: <http://scifinder.cas.org>. Acesso em: 03 fev. 2012

SHEN, Z., REED, J.R., CREIGHTON, M., LIU, D.Q., TANG, Y.S., HORA, D.F., FEENEY, W., SZEWCZYK, J., BAKHTIAR, R., FRANKLIN, R.B., VINCENT, H. Identification of novel metabolites of pioglitazone in rat and dog. **Xenobiotica**, London, v. 33, n. 5, p. 499–509, 2003.

TAHMASEBI, E., YAMINI, Y., SALEH, A. Extraction of trace amounts of pioglitazone as an anti-diabetic drug with hollow fiber liquid phase microextraction and determination by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection in biological fluids. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 877, p. 1923–1929, 2009.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

CAPÍTULO 6

Conclusões Finais

Neste trabalho, as técnicas HPLC e CE foram empregadas na determinação dos fármacos RSG e PGZ e de seus respectivos metabólitos em fração microssomal de fígado de ratos. A HF-LPME foi empregada na etapa de preparação das amostras de ambos os métodos. Os métodos desenvolvidos e validados foram utilizados para estudar o metabolismo *in vitro* desses fármacos. Estas técnicas analíticas forneceram métodos com suficiente resolução, seletividade, precisão, exatidão e detectabilidade para a determinação dos fármacos e seus metabólitos para a finalidade pretendida. A HF-LPME mostrou-se uma técnica robusta, com alto poder de concentração, excelente para a eliminação de interferentes endógenos e de baixo consumo de solventes orgânicos, o que a qualifica para ser utilizada em estudos de metabolismo *in vitro*. Os métodos desenvolvidos nesse estudo destacam-se por serem os primeiros a empregar a HF-LPME para análise simultânea da RSG e PGZ e de seus respectivos metabólitos.

Apesar da menor detectabilidade da CE em relação ao HPLC, esta técnica também é bastante vantajosa para aplicações em estudos de metabolismo devido a sua elevada eficiência, baixo custo e rapidez nas análises. Embora o uso da HF-LPME em conjunto com a CE tenha resultado em limites de quantificação acima dos desejáveis para esse estudo em particular (200 ng mL^{-1}), a combinação dessas duas técnicas é muito promissora e tem a grande vantagem de utilizar quantidades mínimas de solventes orgânicos. A CE ainda não foi descrita na literatura para análise da PGZ e seus metabólitos, portanto, o método desenvolvido nesse estudo destaca-se também quanto a esse aspecto.

Nos estudos de metabolismo *in vitro* da RSG foi possível determinar a cinética enzimática, observando-se que a velocidade máxima para o *N*-Dm-R ($87,30 \text{ nmol min mg}^{-1} \text{ proteína}$) foi maior que a observada para a *p*-OH-R ($51,64 \text{ nmol min mg}^{-1} \text{ proteína}$). Também foi possível observar uma maior afinidade do substrato na formação do *N*-Dm-R ($58,14 \text{ }\mu\text{M}$) em relação à *p*-OH-R ($77,84 \text{ }\mu\text{M}$). A formação preferencial da *N*-Dm-R já havia sido descrita na literatura em um estudo empregando microssomas humanos. Diferenças numéricas entre os dois estudos podem ser explicadas pelo conteúdo de CYP2C (família de enzimas responsáveis pela metabolização da RSG) que difere entre humanos (pmol mg^{-1} de proteínas microssomais) e ratos (638 pmol mg^{-1} de proteínas microssomais).

O metabolismo *in vitro* da PGZ empregando fração microssomal de fígado de ratos mostrou apenas a formação de traços do metabólito M-IV e outro produto não

identificado, com o tempo de migração de aproximadamente 3 minutos. Esses resultados estão de acordo com dados da literatura. Apesar disso, o método desenvolvido pode ser empregado em outros modelos de metabolismo *in vitro* nos quais a formação desses metabólitos seja maior.

Finalmente, empregando HPLC com fases estacionárias quirais, foi desenvolvido um método para análise enantiosseletiva da RSG e seus metabólitos para estudar a racemização desses compostos sob várias condições, principalmente aquelas empregadas em estudos de metabolismo *in vitro*.

Em função de dados da literatura, acreditava-se que a taxa de racemização da RSG fosse lenta o suficiente para a condução do estudo de metabolismo *in vitro* de forma enantiosseletiva. Entretanto, os resultados obtidos no estudo de racemização mostraram que para a manutenção dos enantiômeros puros é necessário que o meio seja ácido (pH 3,5), que as temperaturas sejam baixas (abaixo de 25°C) e preferencialmente, que eles sejam estocados em solventes orgânicos, ou seja, condições inadequadas para realização do estudo de metabolismo *in vitro*.

ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.1046.53.4), intitulado: "Aplicações da Microextração em Fase Líquida (LPME) na Análise Enantioselectiva da Rosiglitazona e de seus Principais Metabólitos: estudos de metabolismo *in vivo* e *in vitro*", de autoria de Leandro Augusto Calixto e de Pierina Sueli Bonato, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 05.11.2009.

Ribeirão Preto, 6 de novembro de 2009

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro